

Université de Sherbrooke

**Étude d'un suppresseur de la transformation dans des lignées cellulaires
révertantes exprimant l'oncogène E1a de l'adénovirus de type 2 .**

par

Dominique Roberge

Département de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Février 1995



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40621-0

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	vii
SOMMAIRE.....	viii

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Culture de cellules et tissus	14
1.1) Cellules	14
1.2) Cultures.....	14
2) Transfection.....	16
2.1) Description des plasmides	16
2.2) Méthode de transfection	16
3) Hybrides	18
4) Propriétés des cellules transformées	18
4.1) Croissance en agar mou	18
4.2) Tumorigénicité chez les souris nues	19
5) Immunoprécipitation	19
6) Dot Blot	20
6.1) Extraction de l'ARN	20
6.2) Déionisation de la formamide et de la formaldéhyde.....	21
6.3) Dot Blot.....	21
6.4) Hybridation	22
7) Mutagenèse d'insertion rétrovirale.....	23
7.1) Description de ZipNéoSV(x)	23
7.2) Infection des cellules G2 par le virus ZipNéoSV(x).....	25

8) Analyse des ADNs cellulaires	25
8.1) Isolation de l'ADN cellulaire	25
8.2) Digestion enzymatique de l'ADN cellulaire.....	26
8.3) Électrophorèse	26
8.4) Transfert de Southern	27
8.5) Pré-Hybridation et hybridation des filtres d'ADN	28
9) Clonage de la jonction cellulaire de T-G2SVX	28
9.1) Gradient de sucrose	29
9.2) Dialyse	29
9.3) Ligation.....	29
9.4) Transformation des bactéries DH5 α	30
9.5) Extraction de l'ADN plasmidique	31
10) Préparation des sondes	31
10.1) Amplification et purification des plasmides.....	31
10.2) Description des sondes	32
10.3) Électrophorèse et élution d'une bande d'un gel d'agarose	33
10.4) Préparation des sondes radioactives	34
11) PCR.....	34
11.1) Oligonucléotides.....	34
11.2) Réaction	35
11.3) Clonage des produits de PCR	36
12) Séquençage.....	37

RÉSULTATS

1) Le gène suppresseur est-il spécifique aux oncogènes adénoviraux?	
(i.e.: E1)	38
1.1) Expression de la protéine T-SV40	42
1.2) Expression de HPV16-E7	42
1.3) Propriétés des cellules transfectées.....	44
2) Le gène suppresseur est-il spécifique à l'espèce?	47
2.1) Expression de E1a	48
2.2) Efficacité de formation de colonies en agar mou (CFE).....	51
2.3) Tumorigénicité	51
3) Peut-il y avoir réversion chez les cellules G2 par mutagenèse d'insertion	
rétrovirale?	52
3.1) Mutagenèse d'insertion rétrovirale avec ZipNéoSV(x).....	54
3.2) Analyse du site d'intégration	55

3.3) Présence du gène E1 dans les différentes lignées cellulaires déterminée par PCR	57
4) Clonage de la jonction cellulaire du provirus intégré ZipNéoSV(x)	59
4.1) Clonage	59
4.2) Fabrication d'une sonde uniquement cellulaire	61
 DISCUSSION	 67
 REMERCIEMENTS	 72
 RÉFÉRENCES	 73
 ANNEXE	 82

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Structure et produits des gènes transformants E1a et E1b de l'Ad2.....	4
Figure 2:	Structure des séquences virales d'Ad2 intégrées dans la lignée cellulaire F4.....	7
Figure 3:	Délétion dans l'ADN de Ad2 intégré dans la lignée cellulaire G4F	10
Figure 4:	Carte du plasmide pZipNéoSV(x)	24
Figure 5:	Immunoprécipitation de l'Ag grand T de SV40 des lignées cellulaires révertantes G2 et G4F transfectées avec le plasmide pneoΔ2005	43
Figure 6:	Expression de l'oncogène E7 dans les cellules révertantes transfectées avec le plasmide pD7	45
Figure 7:	Immunoprécipitation de la protéine E1a des cellules transformées (F4 et 293) révertantes (G2 et G4F) et hybrides (H8, H10, H12).....	50
Figure 8:	Analyse du site d'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans l'ADN des cellules T-G2SVx par transfert de Southern.....	56
Figure 9:	Détermination de la présence du gène E1a dans les cellules F4, G2, T-G2SVx et G2N2 par la technique de PCR.....	58
Figure 10:	Stratégie de clonage des séquences flanquantes au site d'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans les cellules T-G2SV	60
Figure 11:	Analyse de Southern de l'ADN des cellules T-G2SVx digéré par ClaI et BamHI.....	62
Figure 12:	Carte du plasmide pG2SVx-Bam4	63
Figure 13:	Représentation schématique des produits de PCR sur l'ADN de pG2SVx-Bam4.....	65
Figure 14:	Amplification de la jonction cellulaire de T-G2SVx flanquante au site d'intégration du rétrovirus à partir du plasmide pG2SVx-Bam4.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Propriétés des différentes lignées cellulaires utilisées, obtenues à partir de F4	39
Tableau 2:	Transformation des cellules révertantes G2 et des cellules G4F utilisées comme contrôle avec les oncogènes SV40-T et HPV16-E7	41
Tableau 3:	Propriétés des lignées cellulaires hybrides obtenues par fusion des cellules révertantes G2 avec les cellules humaines transformées par Ad5, 293	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ad2	adénovirus de type 2
DMEM	milieu Eagle modifié par Dulbecco ("Dulbecco modified Eagle medium")
DTT	dithiothréitol
E1a	Gène précoce 1a d'adénovirus
E1b	Gène précoce 1b d'adénovirus
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EMS	éthyl méthane sulfonate
GapDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
G-418	généticine
HPV16	Human Papilloma Virus 16
MGBG	méthylglyoxal bis(guanylhydrazone)
μCi	micro curie
néo	néomycine
néo ^r	gène de résistance à la néomycine
NP-40	nonidet P-40
³² P	phosphore 32
PBS A	saline tamponnée
PEG	polyéthylène glycol
PFU	unité capable de former un foyer d'infection ("plaque forming unit")
p/v	poids par volume
[³⁵ S]	soufre 35
SDS	sodium dodécyl sulfate
SSC	salt sodium citrate (20x: 3M NaCl, 0.3M citrate de sodium)
SV40	virus simien 40
SV40-T	antigène grand T de SV40
TE	tampon tris-EDTA
v/v	volume par volume

RÉSUMÉ

Afin d'étudier, de cloner et d'identifier les gènes cellulaires impliqués dans le maintien du phénotype transformé et/ou les gènes cellulaires suppresseurs d'oncogènes, des lignées cellulaires détransformantes ont été isolées, dont G2 et G4F. Elles dérivent toutes deux de la mutagénèse d'une lignée cellulaire de rat transformée par l'Adénovirus de type 2 (Ad2), F4, dont les révertants résistants au MGBG ont été isolés. Les cellules G2 expriment toujours les gènes transformants de l'adénovirus (E1) mais ont perdu le phénotype transformé (elles ne sont plus tumorigéniques).

Les cellules G4F, quant à elles, ont subi une délétion majeure ne laissant intacte qu'environ une copie de la région tardive de l'adénovirus. La réversion dans ce cas n'est attribuable qu'à l'absence des protéines transformantes. Ces dernières cellules sont particulièrement utiles comme contrôle négatif au cours de nos expériences.

Il a été démontré que la lignée cellulaire G2 exprimait un phénotype suppresseur de tumeur dominant en ce qui concerne l'oncogène E1 d'Ad2. En effet, elles sont résistantes à la retransformation par E1a d'Ad mais pas à d'autres oncogènes hétérologues tels que c-myc, N-ras et moyen T de polyome. Il est connu que les oncogènes des virus tumorigéniques à ADN transforment les cellules via un mécanisme commun de séquestration de la protéine suppresseur de tumeur p105-Rb. Les révertants G2 transfectés

à l'aide de plasmide portant les oncogènes grand-T de SV40 ou E7 de HPV-16 sont redevenus transformés, contrairement à ce qui était attendu. Ces résultats suggèrent donc que le phénotype de résistance à la retransformation des cellules G2 est spécifique aux oncogènes adénoviraux.

De plus, nous avons démontré que le phénotype suppresseur de tumeur chez les cellules G2 n'est pas spécifique aux cellules de rat, mais qu'il peut tout aussi bien être fonctionnel chez des cellules humaines. En effet, le phénotype transformant des cellules humaines 293 est supprimé par les cellules G2 dans des hybrides G2-293.

A l'aide de l'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans l'ADN génomique des cellules G2, il a été possible d'inactiver le suppresseur de tumeur. Si l'intégration s'est produite à l'intérieur ou très près du gène suppresseur, il serait utile de cloner la jonction cellulaire et de l'analyser. Un fragment BamHI de 5.5Kb, contenant 4Kb d'ADN rétroviral et 1.5Kb d'ADN cellulaire correspondant à la jonction cellulaire droite, fut cloné. Cet ADN fut utilisé pour la fabrication d'une sonde cellulaire de 0.8Kb pouvant servir ultérieurement pour l'étude plus approfondie du gène suppresseur de la transformation chez les cellules G2.

INTRODUCTION

Il existe plus de 40 types d'adénovirus humains connus (Strauss, 1984). Lequel fut le premier virus d'origine humaine découvert comme étant oncogénique (Trentin et al., 1962; Huebner et al., 1962, 1965; Rabson et al., 1964; Pereira et al., 1965). Tous les sérotypes adénoviraux n'ont pas le pouvoir d'induire des tumeurs chez les animaux, cependant, la plupart ont la capacité de transformer des cellules de mammifères en culture. C'est notamment le cas des adénovirus de sérotype 2 (Ad2) et 5 (Ad5) (membres du sous-groupe non- oncogénique C) qui ne peuvent induire de tumeur directement chez les animaux, mais qui transforment des cellules de rongeurs *in vitro* (Gallimore et al., 1974; Graham et al., 1974; Sharp et al., 1974). Ces cellules transformées, si elles sont injectées à des souris nues, peuvent alors produire des tumeurs chez ces dernières. La transformation cellulaire par Ad2 est provoquée par l'intégration de son génome dans l'ADN cellulaire et à l'expression de ses gènes.

Les gènes adénoviraux responsables de la transformation cellulaire et de l'induction de tumeurs des adénovirus furent identifiés et localisés dans le premier 11% gauche du génome viral (Gallimore et al., 1974; Graham et al., 1974; Van der Eb et al., 1977). Il s'agit de la région précoce 1 (E1). Elle fait partie d'un bloc de 5 gènes exprimés de façon précoce durant le cycle du virus, et joue un rôle important dans la régulation de l'expression des autres gènes viraux (Sharp, 1984).

La région E1 est composée de 2 unités transcriptionnelles, E1a (1.3 à 4.5 mu (unité de cartographie)) et E1b (4.6 à 11.1 mu), chacune produisant différents ARNms et codant pour différentes protéines virales (Chow et al., 1977, 1979; Kitchingman et al., 1977). Si on compare la protéine E1a de différents sérotypes d'Ad, on constate qu'il y a 3 régions conservées qui sont en fait le domaine fonctionnel de la protéine E1a (Green, 1989).

Le gène E1a produit 3 ARNms différents: 13S (1.1Kb), 12S (0.9Kb) et 9S (0.6Kb). Les ARNms 12S et 13S ont un promoteur commun, mais sont épissés différemment (Berk et Sharp, 1978; Chow et al., 1979; Perricaudet et al., 1979; Kitchingman et Westphal, 1980; Baker et Ziff, 1981). L'ARNm 13S code pour une phosphoprotéine de 289 acides aminés (aa) qui induit l'expression des autres gènes viraux précoces et tardifs de l'Ad (E1b, E2, E3, E4) (Berk et al., 1979; Jones et Shenk, 1979; Ricciardi et al., 1981; Montell et al., 1984; Nevins, 1981). D'autre part l'ARNm 12S code pour la protéine de 243 aa responsable de l'indépendance d'ancrage mais n'ayant aucune fonction d'activation de transcription. Seules ces 2 dernières protéines de la région E1a sont requises pour la transformation cellulaire (Montell et al., 1984) mais la protéine de 243 aa semble suffisante à elle seule (Shenk et Flint, 1991). En ce qui concerne l'ARNm 9S, il est transcrit plus tardivement et n'a aucun rôle dans la transformation cellulaire (Fields, 1985; p,211).

Le gène E1a peut aussi induire l'expression de certains gènes cellulaires (Simon et al., 1987; Stein et Ziff, 1984; Nevins, 1981) tels que Hsp 70, DHFR et N-myc (Berk,

1986; Shenk et Flint, 1991; Boulanger et Blair, 1991). Par contre, E1a peut aussi avoir comme effet de diminuer la transcription d'autres gènes cellulaires tels que MHC classe I, β -actine et α -actine (Borelli et al., 1984; Hen et al., 1985; Velcich et al., 1986).

En ce qui concerne la région E1b, elle produit les ARNms 22S (2.2Kb), 13S (1Kb) et 9S (Fields, 1985; p,211). Les ARNms 22S et 13S sont transcrits tôt durant l'infection et possèdent les mêmes séquences terminales 3' et 5'. Ces derniers codent pour différentes protéines virales impliquées dans la transformation, comme la protéine de 19Kd (traduite à partir des ARNms 22S et 13S) qui est retrouvée au niveau de la membrane cytoplasmique et des structures nucléaires, et la protéine de 55Kd, venant de l'ARNm 22S, qui serait impliquée dans l'induction de tumeur chez les souris nues (Fields, 1985; p,187) lorsqu'elle est associée à une protéine cellulaire de 54Kd (Sarnow et al., 1982). L'ARN 9S est plus tardif et ne joue aucun rôle dans la transformation (Branton et al., 1985). La figure 1 présente les principaux produits des régions E1a et E1b de l'Ad précédemment décrits.

La transformation cellulaire comporte 2 étapes: l'immortalisation et la transformation. Les produits du gène E1a immortalisent des cellules primaires (Hauweling et al., 1980; Cone et al., 1988; Branton et al., 1985) mais la coopération avec les produits du gène E1b est nécessaire à la transformation complète des cellules. Toutefois, les produits du gène E1b sont incapables de transformer par eux-mêmes (Ruley, 1983; Van Den Elsen et al., 1983) et leur transcription est absolument dépendante de la présence du produit du gène E1a (Flint, 1981).

La transformation maligne des cellules est un système impliquant plusieurs composantes dont l'interaction d'un ou plusieurs oncogènes avec un gène cellulaire effecteur. On a, en effet, noté la formation de complexes stables entre des protéines codées par des virus oncogènes à ADN et des protéines de cellules hôtes tel que moyen T de polyome avec pp60^{c-src}, grand T de SV40 avec p53 et E1b de l'adénovirus avec p53 (Courtneidge et Smith, 1983; Lane et Crawford, 1979; McCormick et Harlow, 1980; Sarnow et al., 1982). Ces complexes auraient un effet sur la stabilité de la protéine cellulaire ou sur son activité catalytique. Ces changements joueraient un rôle dans les fonctions de transformation de ces protéines (Whyte et al., 1988).

Il existe également des gènes cellulaires suppresseurs de tumeurs (ou d'oncogènes) qui, lorsqu'ils sont inactivés, amènent la transformation de la cellule. Le gène de susceptibilité au rétinoblastome (Rb) en est un exemple. Nous en reparlerons un peu plus loin.

Le laboratoire du Dr. Weber s'intéresse aux gènes cellulaires impliqués dans le maintien du phénotype transformé ainsi qu'aux gènes suppresseurs de tumeur. Dans le premier cas, l'identification d'un gène cellulaire requis par le gène E1 d'Ad pour le maintien du phénotype transformé, contribuerait à une meilleure compréhension du mécanisme de transformation. Dans le second cas, l'étude d'un suppresseur de tumeur aurait non seulement une importance théorique mais fournirait une base pour une toute nouvelle approche dans la thérapie du cancer.

Plusieurs lignées cellulaires furent obtenues à la suite de la transformation par Ad.

La lignée cellulaire F4 provient de la transformation de cellules de cerveau de rat embryonnaire par Ad2 (Gallimore et al., 1974). Ces cellules de morphologie épithéliale, ont acquis des propriétés caractéristiques de cellules transformées telles que: a) perte d'inhibition de contact (donc croissance à haute densité cellulaire); b) capacité de croître en présence d'une faible quantité de sérum; c) croissance avec indépendance d'ancrage; d) formation de tumeurs chez des rats et des souris immunosupprimés (Sircar et al., 1987).

Les cellules F4 ne contiennent qu'une fraction du génome d'Ad2 intégré dont la région responsable de la transformation, E1. En effet, la fraction terminale gauche du génome viral de .2 à 62 mu est liée de façon covalente à une séquence d'ADN de l'extrémité droite du génome s'étendant, de 100 à 95.8 mu. Cette dernière portion est inversée ce qui amène une juxtaposition de la position .2 mu à la position 95.8 mu (voir figure 2a) (Gallimore et al., 1974; Sambrook et al., 1975; Sambrook et al., 1979). Cette séquence d'ADN réarrangée d'Ad2 additionnée d'environ 8Kb d'ADN cellulaire, est répétée en tandem 16 fois chez les cellules F4 (voir figure 2b). Elle possède donc 16 copies de l'adénovirus tronqué intégré.

Pour nous aider dans l'étude des gènes cellulaires impliqués dans la transformation, différentes lignées cellulaires révertantes (i.e. de phénotype normal) ont été obtenues dans notre laboratoire à partir de la lignée transformée F4; deux de ces révertants ont été conservés soit G2 (qui était le meilleur candidat) et G4F qui est utilisé comme contrôle car la réversion

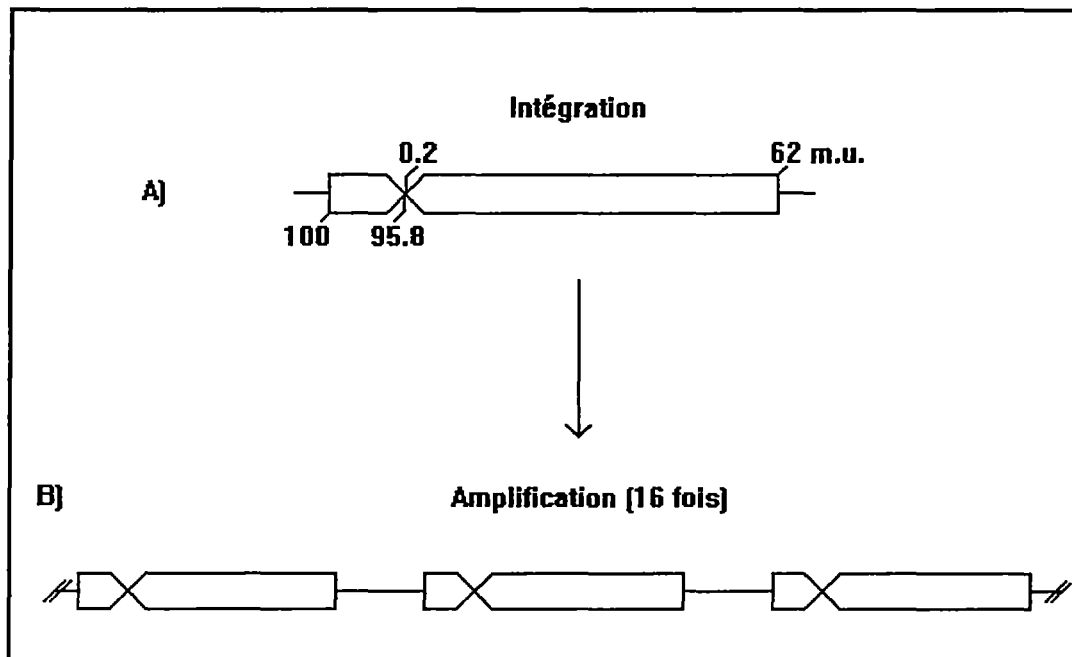


Figure 2: Structure des séquences virales d'Ad2 intégrées dans la lignée cellulaire F4.

Les rectangles représentent l'ADN de Ad2 et les traits désignent l'ADN cellulaire. A) Le segment du génome viral s'étendant de 0.2 à 62 m.u. est lié de façon covalente au segment de 95.8 à 100 m.u. Celui-ci est inversé par rapport à l'orientation de départ ce qui amène la juxtaposition des positions 95.8 à 0.2 m.u. B) Il y aurait eu ensuite amplification de l'ADN viral intégré incluant 8 Kb de séquences cellulaires flanquantes donnant naissance à 16 copies répétées en tandem.

dans ce cas est due à la perte des gènes transformants E1 de l'adénovirus. Voici une brève description de l'obtention de ces 2 lignées cellulaires.

La lignée cellulaire F4 a subi une mutagénèse au EMS (éthyl méthane sulfonate) induisant des mutations ponctuelles dans l'ADN cellulaire. Suite à une sélection des révertants à l'aide d'une drogue anti-cancer, MGBG (méthylglyoxal bis (guanylhidrazone)), tuant préférentiellement les cellules à prolifération rapide (cellules transformées) (Rupniak et Paul, 1978, 1980), la lignée G2 fut isolée (Sircar et al., 1987, 1988; Weber et al., 1989, 1990).

Les cellules révertantes G2 ont une capacité de croissance en agar mou diminuée par rapport aux cellules parentales F4, et ne peuvent pas croître en présence d'une faible quantité de sérum. De plus, elles ont perdu la faculté de former des tumeurs chez des souris nues (Sircar et Weber, 1988). La perte du pouvoir tumorigénique observée chez cette lignée cellulaire peut être due, soit à une perte ou à une mutation dans un gène cellulaire requis pour le maintien du phénotype transformé ou à une activation d'un gène cellulaire suppresseur. Toutefois notre laboratoire a démontré que la détransformation de cette lignée n'était pas due à la perte ou à l'inactivation des gènes responsables de la transformation d'Ad. En effet, G2 possède toujours les gènes transformants E1a et E1b de l'adénovirus (Sircar et al., 1987) qui sont toujours exprimés (Sircar et al., 1988). L'intégrité fonctionnelle de E1a est confirmée par la capacité des cellules G2 de compléter un mutant de délétion de la région E1 (dl312) (Rodrigues et al., 1989). De plus, G2 est résistant à la retransformation par l'oncogène homologue E1 mais non par des oncogènes hétérologues tels que N-ras, c-myc ou moyen T de polyome (Sircar et al.,

1988). La protéine E1a forme un complexe avec p105-Rb et 300K dans les cellules G2 avec la même efficacité que dans les cellules F4 (Weber et al., 1991) et la protéine Rb n'est pas présente en excès dans les cellules G2 donc le lien entre E1a et Rb n'est pas une condition suffisante pour la transformation. Ces résultats suggèrent l'activation d'un gène cellulaire suppresseur de tumeur dominant, spécifique à l'Ad.

Suite à la transfection des cellules F4 avec l'ADN des cellules G2 et la sélection des révertants à l'aide du MGBG, le laboratoire du Dr. Weber a obtenu la lignée cellulaire révertante G4. Toutefois, celle-ci était très instable, et après une centaine de générations, il y eu apparition d'îlots de cellules de morphologie transformée. Les 2 types cellulaires retrouvés ont été sous-clonés; G4F (cellules fibroblastiques entre les îlots) et G4NF (cellules transformées provenant des îlots). La lignée G4F est révertante car il y a eu délétion des gènes transformants de l'Ad. En effet, elle a subi un évènement majeur de délétion des 16 copies virales intégrées ne laissant intacte qu'une copie de la région tardive de l'adénovirus. L'hybridation de l'ADN cellulaire des cellules G4F digéré par HindIII avec une sonde génomique d'Ad2 a permis de montrer qu'il reste les fragments droit (A) et gauche (K) du virus, fusionnés (figure 3) (Dion et al., 1992).

Plusieurs autres révertants provenant de lignées cellulaires transformées par des oncogènes viraux (Ki-ras, Ha-ras, SV40, v-fos, Ad) ayant une tumorigénicité réduite ont également été isolés (Noda et al., 1983; Samid et al., 1987; Kitayama et al., 1989; Ryan et al., 1985; Bauer et al., 1987; Zarbl et al., 1987). Ils sont également utilisés pour l'étude

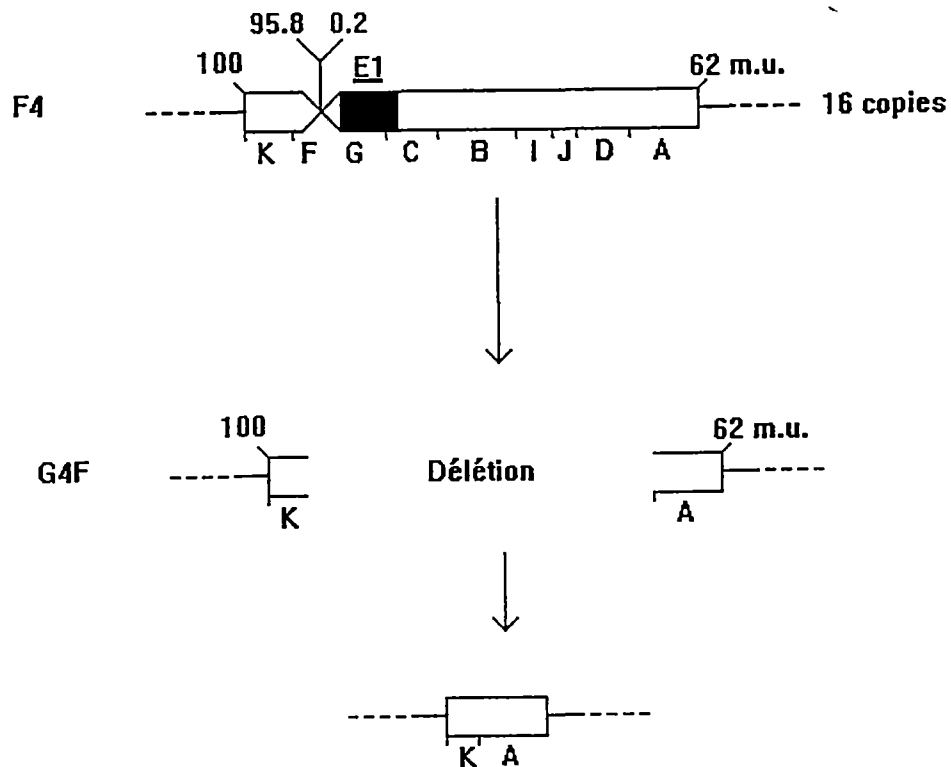


Figure 3: Délétion dans l'ADN de Ad2 intégré dans la lignée cellulaire G4F.

La région rectangulaire du haut représente une des 16 copies de l'ADN adénoviral intégré en tandem dans le génome cellulaire (représenté par un trait fin) des cellules F4. Les lettres A à K correspondent aux différents fragments générés par digestion enzymatique avec HindIII (classifiés selon leur taille). Le rectangle noir délimite la région transformante E1 de l'Adénovirus. L'ADN des cellules G4F a subi un évènement majeur de délétion des 16 copies virales intégrées, ne laissant intacte qu'une partie de la région tardive de l'Adénovirus soit le fragment droit (A) et le fragment gauche (K) de l'ADN du virus, fusionnés.

des mécanismes de transformation. Une propriété intéressante de ces révertants est que chacun d'eux exprime une protéine oncogénique fonctionnelle et chacun est résistant à la retransformation par des oncogènes connus, tout comme les cellules G2. Noda a déjà réussi à cloner un gène cellulaire suppresseur de la transformation médiée par Ki-ras (Krev-1) semblant avoir une similarité structurale avec la protéine ras (Kitayama et al., 1989).

Deux gènes suppresseurs de tumeur sont largement étudiés. Il s'agit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (Rb) et de p53, qui sont fréquemment mutés dans plusieurs types de cancer humain. D'autres gènes suppresseurs potentiels impliqués dans certains types de cancer particulier ont également été identifiés soient apc et dcc (impliqués dans le cancer du colon), wt-1 (tumeur de Wilm) et nf-1 (neurofibromatose) (Weinberg, 1991).

p53 est une protéine nucléaire qui agit comme facteur de transcription et semble réguler la synthèse d'ADN. La protéine p53 se lie à l'antigène grand T de SV40 (SV40-T) et E1b d'Ad5.

On retrouve le produit du gène Rb dans tous les types cellulaires et tout au long du cycle cellulaire. Toutefois il est inactivé dans plusieurs types de cancer humain (Fattaey et al., 1993). Le gène de 200 Kb (Hong et al., 1989) est transcrit en un ARNm de 4.7 Kb qui code pour une protéine de 105 Kd (Lee et al., 1987).

La protéine E1a s'associe à la protéine p105-Rb et l'on a longtemps cru que cette association avait pour effet d'inactiver Rb entraînant la transformation cellulaire (Whyte et al., 1988). Cependant, de récentes découvertes ont démontré que l'association p105-Rb au facteur de transcription E2F avait pour conséquence d'inactiver ce dernier (Chellappan et al., 1991). Weintraub et ses collègues (1992) suggèrent que Rb-E2F est un complexe actif qui inhibe la transcription et que la protéine E1a d'Ad prévient le lien Rb-E2F en s'associant à Rb. E1a peut même dissocier le complexe Rb-E2F (Bagchi et al., 1990; Chelleppan et al., 1991; Raychaudhuri et al., 1991). Le lien entre E2F et Rb peut expliquer en partie l'action de Rb dans le contrôle de la croissance cellulaire.

La protéine Rb est la cible des produits oncogènes de virus tumorigéniques à ADN: E1a (Whyte, 1988), SV40-T et d'autres polyomavirus (DeCaprio et al., 1988) et HPV-E7 (Dyson et al., 1989). L'interaction de ces protéines avec le produit du gène Rb présente un aspect important dans la capacité oncogénique de ces virus. Les séquences de la protéine E1a, qui sont essentielles pour la dissociation du complexe E2F-Rb et pour l'association à p105-Rb, ont des homologies significatives avec SV40-T et HPV16-E7 (DeCaprio et al., 1988; Dyson et al., 1989; Phelps et al., 1988; Kimelman et al., 1985). De plus HPV16-E7 et SV40-T peuvent également dissocier le complexe E2F-Rb, et la dissociation est dépendante du domaine de ces protéines virales essentielles pour la transformation. Ceci suggère que ces virus puissent avoir une activité commune (Chellappan et al., 1992).

Mon projet se divise en 4 principales parties visant l'étude plus approfondie du gène suppresseur des cellules G2.

1) La première partie consiste à vérifier si le révertant G2, qui exprime toujours les protéines oncogéniques fonctionnelles, est résistant à la retransformation par des oncogènes de la même famille. Les oncogènes SV40-T et HPV16-E7 ont été utilisés pour cette étude étant donné qu'ils semblent faire partie de la même famille capable de lier Rb et de dissocier le complexe Rb-E2F, que E1a.

2) Cette seconde partie de mon étude vise à déterminer si le gène suppresseur présent dans les cellules G2 est spécifique à l'espèce, c'est-à-dire aux cellules de rat, ou si, au contraire, il peut-être fonctionnel dans un autre type cellulaire, tel l'humain. Des hybrides entre les cellules G2 et les cellules humaines transformées par Ad5, 293 sont utilisés pour cette étude.

3) Dans la troisième partie nous voulons voir s'il pouvait y avoir réversion du phénotype non-transformé des cellules G2 par mutagénèse d'insertion rétrovirale. Le vecteur rétroviral pZIPnéoSV(x) fut utilisé pour infecter les cellules G2, ce qui a donné naissance à la lignée T-G2SVx.

4) Finalement, nous tentons de cloner le gène cellulaire suppresseur qui semble être inactivé par l'insertion de ZIPnéoSV(x).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) CULTURE DE CELLULES ET TISSUS

1.1) Cellules:

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées lors de cette étude, soient: F4, G2, G4F, T-G2SVx, G2N2 et les cellules 293. Voici une brève description de ces lignées:

La lignée cellulaire **F4**, fournie par Bruce Stillman (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.), résulte de la transformation de cellules de cerveau d'embryons de rat par Ad2 (Gallimore et al., 1977). Cette lignée, de phénotype transformé, possède 16 copies d'un fragment d'ADN d'Ad2 intégrées en un site unique (Flint, 1981). Une description plus détaillée des caractéristiques phénotypiques de cette lignée cellulaire est décrite par Gallimore et al. (1974), Sambrook et al. (1975, 1979) et Lewis et Mathews (1981).

Suite à la mutagénèse des cellules F4 au EMS induisant des mutations ponctuelles, un clone résistant à 15 μ M de MGBG a été sélectionné (Sircar et al., 1987). Cette lignée, nommée **G2**, possède un phénotype non transformé et n'a subi aucun réarrangement apparent au niveau des séquences virales intégrées.

Les cellules G4 proviennent de la transfection de la lignée F4 par l'ADN de G2 suivie d'une sélection au MGBG (Rodrigues et al., 1987). A partir de ces dernières, le sous-clone **G4F** fut isolé. Il a subi un événement majeur de délétion de la région adénovirale intégrée dont la perte des gènes transformants (démontré par analyse de southern (Dion et al., 1992)), ne laissant intacte qu'environ une copie de la région tardive de l'adénovirus. Ces cellules présentent donc un phénotype non transformé et nous serviront de contrôle lors de nos différentes expériences.

La lignée cellulaire **T-G2SVx**, quant à elle, résulte de l'infection des cellules G2 par le virus ZipNéoSV(x) dérivant d'un vecteur recombinant de la leucémie murine de Moloney, pZipNéoSV(x) (Cepko et al., 1984). Il s'agit d'un clone cellulaire retransformé. Une description plus détaillée de l'obtention de cette lignée sera élaborée à la section 7.

La lignée **G2N2** dérive des cellules G2 infectées par le virus N2 (Armentano et al., 1987) et est également de phénotype transformé.

Les cellules **293**, utilisées pour la formation d'hybrides avec G2, sont des cellules humaines transformées par Ad5 (Graham, 1987) qui poussent bien en agar mais qui présentent une faible tumorigénicité.

1.2) Culture:

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées en pétris dans du milieu DMEM (milieu Eagle modifié par Dulbecco) contenant 5% (v/v) de sérum de veau nouveau-né (Flow laboratories), inactivé à 56°C pendant 50 minutes, et 2.5 µg/ml de fongizone (Amphotéricine B). Pour les cellules T-G2SVx et G2N2 on additionne en plus, 200 µg/ml de G-418 dans le milieu pour maintenir leur résistance. On conserve les cellules dans un incubateur air/CO₂ (10%) à 37°C.

2) TRANSFECTION

2.1) Description des plasmides:

- a) pnéoΔ2005:** Plasmide contenant l'antigène grand-T de SV40 (SV40-T). Il exprime le marqueur néo permettant la résistance des cellules au G-418. Il ne peut produire l'antigène petit-t (SV40-t) à cause d'une délétion dans l'intron grand-T, entre les unités de cartographie .54 et .59. (Asselin et Bastin, 1985).
- b) pD7:** Ce plasmide contient entre autre l'oncogène E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV16-E7) (Marshall et al., 1989). Celui-ci

nous a été fourni par Mary Pater (Memorial University of Newfoundland, St-John). Il transforme des lignées cellulaires établies mieux que l'ADN viral, mais l'expression de l'oncogène E7 ne peut être détectée qu'au niveau de l'ARN (communication personnelle de M. Pater).

c) pSV2neo: Plasmide utilisé lors de la cotransfection afin d'augmenter l'efficacité de transformation. Il contient le gène de résistance au G-418 (Southern et Berg, 1982) et constitue notre moyen de sélection des cellules transfectées par pD7.

2.2) Méthode de transfection:

Les cellules G2 et G4F (contrôle) sont transfectées par la méthode modifiée de coprécipitation au calcium phosphate (Wigler et al., 1979). Dix µg/pétri d'ADN plasmidique et dans le cas de pD7, 2 µg de pSV2néo en plus, sont utilisés pour la transfection. Brièvement, 6×10^5 cellules sontensemencées dans des pétris de 10 cm, 24 heures avant la transfection. On transfecte avec la quantité d'ADN prescrite plus tôt. Quatre heures plus tard, les cellules subissent un choc au glycérol (10% dans PBS A) et sont incubées à 37°C. Deux jours plus tard, les cellules sont passées en présence de 400 µg/ml de G-418 (concentration effective). On pique les colonies bien isolées et on les établit en cultures séparées. On nomme les clones obtenus comme suit; P1C3 par

exemple, P désignant le numéro du pétri (pétri 1 dans ce cas) et C la colonie piquée (colonie 3).

3) HYBRIDES:

Les cellules révertantes de rat G2 sont d'abord transfectées avec un plasmide portant le gène de résistance à l'hygromycine B, pY3 (Blochlinger et Diggelmann, 1984), tandis que les cellules humaines 293 sont transfectées avec le plasmide pSV2Néo portant le gène néo^r. Ces 2 types cellulaires sont fusionnés à l'aide de polyéthylène glycol (PEG-1000, Sigma) selon la méthode décrite par Craig et Sager (1985). La sélection des hybrides G2-293 s'effectue en utilisant 400 µg/ml de généticine (G-418) (Gibco) et 100 µg/ml d'hygromycine B (Calbiochem). Le statut d'hybride est confirmé par compte chromosomique, effectué dans le laboratoire du Dr. Weber par Sucheta Sircar.

4) PROPRIÉTÉS DES CELLULES TRANSFORMÉES

4.1) Croissance en agar mou:

Nous utilisons la technique décrite par Montell (1984). L'ensemencement de 5×10^3 cellules se fait dans des pétris de 5 cm contenant 4 ml d'agar mou (0.33% Agar Noble, Difco) et du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum foetal de veau (Gibco). Une couche de 2 ml est ajoutée lorsque le tout est solidifié. Nous incubons de 3 à 4 semaines et par la suite les colonies sont comptées à l'aide d'un microscope.

4.2) Tumorigénicité chez les souris nues:

Pour déterminer le potentiel tumorigénique des différentes lignées cellulaires, on utilise des souris athymiques Balb/c nu/nu. Elles subissent des injections sous-cutanées de 3×10^5 ou 2×10^6 cellules à 3 sites différents pour chaque souris. Ces souris sont observées pendant une période de 120 jours.

5) IMMUNOPRÉCIPITATION

Le marquage des cellules (80% confluentes) s'effectue pendant 2 heures avec 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{35}S] Méthionine (Amersham) (1000 $\mu\text{Ci/mmol}$) dans du DMEM sans méthionine. Ces cellules sont par la suite lysées à l'aide du tampon ELB (50 mM HEPES, pH 7.0, 250 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) et le surnageant est centrifugé 5 minutes à 12 000g. On immunoprécipite le surnageant avec 10 μl d'antisérum SV40-T ou E1a selon le cas, pendant une heure sur glace suivit, d'une incubation d'une heure à 4°C avec 20 μl d'une suspension de 50% de protéine A (Pharmacia) dans le tampon ELB avec une agitation continue. Les billes de protéine A - sépharose sont par la suite lavées à 3 reprises dans le tampon ELB, resuspendues dans le tampon de lyse 1X, chauffées à 70°C, 15 minutes et centrifugées à 4°C, 5 minutes. Le surnageant est déposé sur un gel 9% ou 12% SDS-polyacrylamide et migre approximativement 2 heures à 40 mA. Le gel est séché et exposé de 18 heures à 3 jours à -70°C.

L'antisérum SV40-T nous a été fourni par Cathy Rundell (Northwestern University, Chicago) et nous sert à détecter l'expression de SV40-T dans les cellules transfectées par ce dernier.

L'anticorps monoclonal anti-E1a spécifique (M73) provient de la compagnie Oncogene Science Inc (Manhasset, N.Y.) et nous permet de détecter la présence de E1a et la formation du complexe E1a avec les protéines Rb et 300K dans des cellules hybrides entre G2 et 293.

6) DOT BLOT

6.1) Extraction de l'ARN:

L'ARN des cellules G2 et G4F transfectées ou non par HPV16-E7 ou par SV40-T, est purifié en présence de 1 mM de vanadyl ribonucléoside complexe (BRL), un inhibiteur de RNase, 3.5 M urée et 1% SDS (dans 0.24 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.01 M EDTA) suivi par une extraction au phénol(*)-chloroforme. La phase aqueuse est recueillie et précipitée avec 0.3 M d'acétate d'ammonium pH 6 et 2.5 volumes d'éthanol puis conservée à -70°C. Les tubes sont centrifugés à 10 K rpm à 4°C pendant 30 minutes dans le rotor ss34 de Sorval. Les culots sont séchés à l'air libre pendant quelques minutes.

(*) Le phénol (BDH qualité ACS) est saturé avec le tampon 100 mM Tris pH non ajusté, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl et du 8-hydroxyquinoline 1% (P/V) jusqu'à ce que le pH du phénol soit d'environ 7.5.

6.2) Déionisation de la formamide et de la formaldéhyde:

La formaldéhyde 37% et la formamide utilisées pour la préparation des échantillons (section 6.3) doivent être déionisées. Cinq cents ml de formaldéhyde 37% sont agités pendant 24 heures avec 300 ml de résine (Analytical grade mixed bed resin AG-501-X8D) de porosité moyenne (20 à 50 mesh) distribuée par BioRAD. La résine est éliminée par filtration du mélange sur un Whatman 3MM.

La formamide est déionisée selon le même procédé: 50 ml de formamide sont agités avec 5 gr. de résine pendant 2 fois 30 minutes pour neutraliser le pH. Les solutions sont conservées à -20°C.

6.3) Dot Blot:

L'ARN cytoplasmique précipité est resuspendu dans une solution 50% formamide déionisée, 5% formaldéhyde déionisée-MOPS (Sigma Chem. co.). Les échantillons sont dilués dans 20X SSC et l'ARN correspondant à environ 3×10^6 cellu-

les/puit est déposé en duplicata sur une membrane de nitrocellulose préalablement trempée dans du 20X SSC, sur un appareil de filtration BRL.

L'ARN est par la suite fixé sur la membrane en chauffant pendant 2 heures à 80°C.

6.4) Hybridation:

La préhybridation des filtres de nitrocellulose se fait à 42°C pendant 24 heures dans la solution suivante: 50% formamide, 5X Denhardt, 5X SSC, 100 µg/ml d'ADN de thymus de veau et 100 µg/ml d'ARN de levure (yeast). Par la suite les filtres sont transférés dans la même solution contenant en plus la sonde E7 ou GapDH (selon le cas) marquée au ³²P (voir section 10). L'hybridation se poursuit durant 24 heures à 42°C.

Les filtres sont lavés à 2 reprises dans du 2X SSC/ 1% SDS à la température de la pièce pendant 5 minutes suivi de 2 lavages d'une heure à 65°C dans du 0.2X SSC/ 0.1% SDS.

Les filtres sont séchés et exposés sur un film KODAK X-Omat-AR à -70°C pour une durée variable (selon l'intensité du signal).

7) MUTAGÉNÈSE D'INSERTION RÉTROVIRALE

7.1) Description de ZipNéoSV(x):

Il s'agit d'un vecteur recombinant de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) élaboré par Cepko et al. (1984) qui nous a été fourni par B. Roberts du MIT à un titre de 5×10^4 à 1×10^5 PFU/ml (le stock viral est obtenu à partir des cellules d'empaquetage Psi-2).

Le plasmide pZipNéoSV(x) est composé de l'unité transcriptionnelle de MoMLV dérivée du provirus intégré (Hoffman et al., 1982) et des séquences de pBR322 nécessaires pour la propagation de l'ADN dans E. coli. Les principales séquences de MoMLV retenues sont: les LTRs (long terminal repeat) nécessaires pour l'initiation de la transcription virale et pour la polyadénylation des transcrits, ainsi que pour l'intégration; les séquences nécessaires pour la transcription réverse du génome viral; les séquences pour l'encapsidation des ARNs viraux; et les signaux d'épissages 5' et 3'. Deux sites de restriction ont été insérés soient BamHI et XhoI. Dans le site XhoI, on a introduit le gène Néo dérivant du transposon Tn5 (codant pour la résistance au G-418 dans les cellules de mammifères et à la kanamycine dans E. coli) ainsi que les origines de réplication de SV40 et de pBR322 (Figure 4).

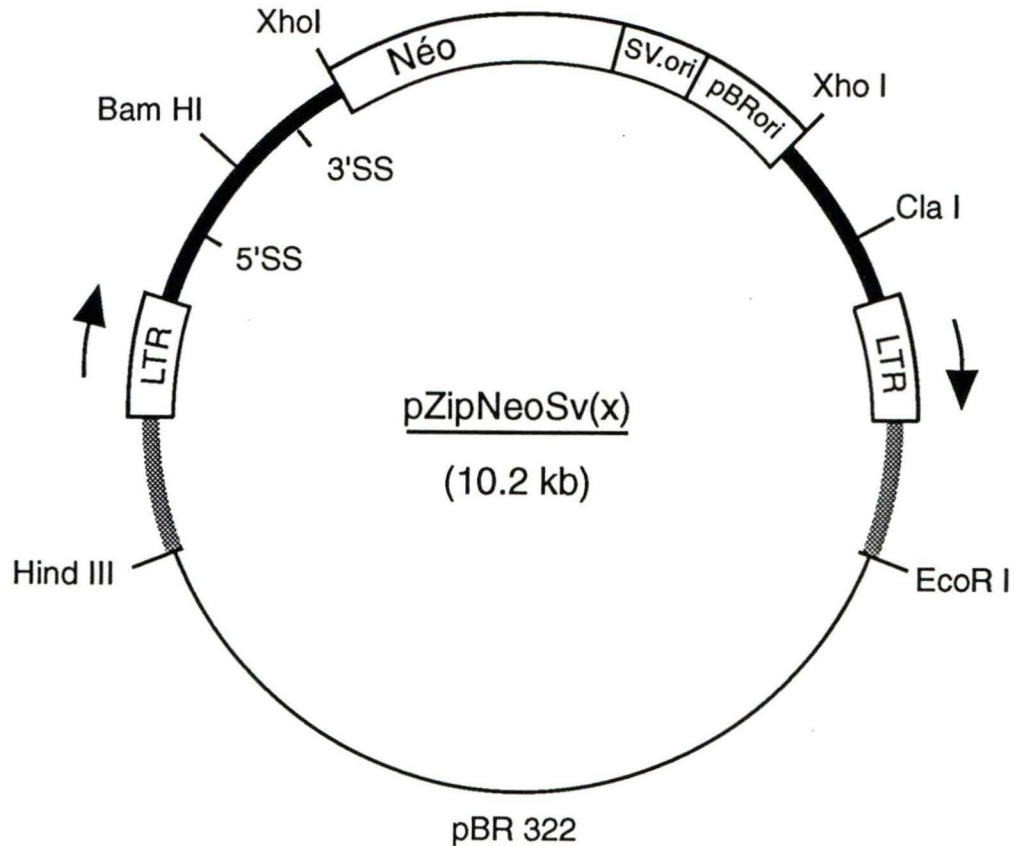


Figure 4: Carte du plasmide pZipNéoSV(x).

Ce vecteur recombinant fut construit à partir de l'unité transcriptionnelle de MoMLV (trait gras et encadré), dérivé du provirus intégré (Hoffman et al., 1982), et des séquences de pBR322 nécessaires pour la propagation de l'ADN dans *E. coli*. Les séquences du MoMLV utilisées incluent: 1) les LTRs nécessaires pour l'initiation de la transcription virale et pour l'intégration du virus dans l'ADN cellulaire, 2) les séquences nécessaires pour l'encapsidation de l'ARN viral et 3) les signaux d'épissages 5' (5'ss) et 3' (3'ss). Les séquences rétrovirales codant pour les polypeptides gag, pol et env sont remplacées par 2 sites de restriction BamHI et XhoI. A l'intérieur du site XhoI, on a intégré le fragment Néo dérivant du transposon Tn5 codant pour la résistance au G-418 dans les cellules de mammifères et à la kanamycine dans les bactéries, ainsi que les séquences d'ADN codant pour les origines de réplication de SV40 (SV.ori) et pBR322 (pBRori). L'expression du gène Néo est contrôlée par les séquences enhancer du MoMLV. Les traits hachurés représentent des séquences de souris et le trait fin dérive du plasmide pBR322.

Cepko et al., (1984)

Il est particulièrement utile pour récupérer les séquences d'ADN chromosomique flanquantes au site d'intégration du rétrovirus dans les cellules de mammifères. Il sert alors de vecteur navette entre les cellules de mammifères et les bactéries.

7.2) Infection des cellules G2 par le virus ZipNéoSV(x):

La lignée cellulaire G2 (90% confluente) est infectée avec le virus ZipNéoSV(x) (5×10^4 à 1×10^5 PFU/ml) produit dans les cellules psi-2, 3 heures avec une agitation occasionnelle à 37°C.

Après une sélection au G-418 (500 µg/ml), les colonies résistantes sont isolées séparément et testées pour la formation de tumeur chez des souris nues.

8) ANALYSE DES ADNs CELLULAIRES

8.1) Isolation de l'ADN cellulaire:

Les manipulations se font à 4°C. Les pétris contenant les cellules à 95% de confluence (1×10^7 cellules) sont rincés 2 fois avec une solution froide de PBS A (NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4). Par la suite, on détache les cellules du pétri à l'aide d'un policeman et on les centrifuge dans une quantité minimum de PBS A (137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) (3 ml/pétri). Le culot de

cellules est ensuite lysé dans un tampon RSB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl et 3 mM MgCl₂) contenant 0.1% de NP40 (0.1 ml/10⁶ cellules), avec une agitation vigoureuse de 3 à 5 minutes sur glace. Les noyaux obtenus par centrifugation sont ensuite traités à la protéinase K (10 µg/ml) dans un tampon d'arrêt 1X (5% SDS, 0.2 M EDTA, pH 8) à 37°C pour un minimum de 6 heures (habituellement toute la nuit). L'ADN ainsi obtenu est purifié à l'aide de 3 extractions au phénol/chloroforme (1:1) suivies d'une dialyse de 2 jours dans un tampon TE (1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) à 4°C. La concentration des ADN purifiés est évaluée à l'aide de pètres d'agarose avec bromure d'éthidium selon la méthode décrite par Davis et al. (1980) ou en mesurant la densité optique à 260nm.

8.2) Digestion enzymatique de l'ADN cellulaire:

L'ADN de la lignée cellulaire T-G2SVx a été digéré à l'aide de l'endonucléase de restriction BamHI ou SalI suivant les conditions déterminées par la compagnie Pharmacia. Toutefois, afin de s'assurer d'une digestion complète de l'ADN, la quantité d'enzyme utilisée fut augmentée d'un facteur de 3 à 10, donc de 3 à 10 unités d'enzyme par microgramme d'ADN à cliver. De plus, afin de vérifier si la digestion est complète, on utilise 10 µl du mélange auquel on ajoute 0.4 µg de plasmide pBR322.

8.3) Electrophorèse:

Aux échantillons d'ADN à être déposés sur gel, le tampon de dépôt est ajouté à raison de 1/5 du volume total (solution 5x: 0.2 M EDTA, 1% SDS, 50% glycérol,

50 mM Tris, 1 mg/ml Bromophénol bleu). On prépare de la même façon le marqueur de poids moléculaire "1Kb DNA Ladder" (BRL) ou le marqueur " λ HindIII" (BRL).

Les électrophorèses sont réalisées sur gel d'agarose (Seakem ME agarose, FMC) 0.8% ou 1% (p/v) selon la taille des fragments à séparer, préparé dans le tampon TBE (50 mM Tris base, 50 mM acide borique, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) qui sert également de tampon de migration. La migration s'effectue entre 30 et 100 V (voltage constant) de 2 à 18 heures selon la grandeur du gel.

Le gel est ensuite coloré pendant 30 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et photographié sous une lampe ultraviolette (254 nm) à l'aide d'un film polaroid type 57.

8.4) Transfert de Southern:

Le transfert de l'ADN du gel d'agarose à une membrane de nylon HYBOND-N d'Amersham s'effectue selon la méthode décrite par Southern (1975) et modifiée par Sambrook et al., pp. 9.34 à 9.40 (1989). L'ADN ainsi transféré est fixé sur le filtre de façon covalente par exposition pendant 5 minutes à la lumière ultraviolette et séché 2 heures à 80°C.

8.5) Préhybridation et hybridation des filtres d'ADN:

La préhybridation et l'hybridation des filtres d'ADN se font selon la méthode de Wahl et al. (1979) sauf que l'on remplace l'ADN de sperme de saumon par de l'héparine. Pour la solution de préhybridation, on ajoute 0.5 mg/ml d'héparine et pour la solution d'hybridation 0.05 mg/ml est ajouté. La préhybridation se fait de 1 à 4 heures et l'hybridation se poursuit de 16 à 24 heures. Les filtres sont lavés 2 fois 5 minutes à la température de la pièce dans une solution 2X SSC et 1% SDS, et 2 fois 30 minutes à 60°C dans 0.2X SSC et 0.1% SDS.

Les filtres sont par la suite séchés et exposés avec un film Kodak X-omat-AR à -70°C pour une durée variable (selon l'intensité du signal) en utilisant un écran intensificateur.

9) CLONAGE DE LA JONCTION CELLULAIRE DE T-G2SVX

Après digestion de l'ADN cellulaire de T-G2SVx par SalI ou BamHI, le produit de la digestion est déposé sur un gradient de sucrose.

9.1) Gradient de sucrose:

Le gradient est préparé en déposant dans un tube à centrifuger 3 ml de sucrose 40% et la même quantité de sucrose 30%, 20% et 10%. Le tube est par la suite centrifugé 3 heures à 27 000 rpm à 12°C afin de générer le gradient. Les échantillons d'ADN (T-G2SVx digéré) sont déposés délicatement sur le dessus du gradient et centrifugé 18 heures à 27 000 rpm à 12°C. Suite à la centrifugation l'on recueille les échantillons par fractions de 30 à 40 gouttes. Une partie de chacune de ces fractions est déposée sur un gel d'agarose 0.8%. Celui-ci est transféré sur filtre de nylon et hybridé avec une sonde Néo marquée au ^{32}P (voir section 10) afin d'identifier la ou les fractions contenant le fragment désiré, c'est-à-dire le fragment contenant une partie du ZipNéoSVx et une partie d'ADN cellulaire.

9.2) Dialyse:

Les échantillons ainsi identifiés sont rassemblés et dialysés toute la nuit à 4°C dans le tampon de dialyse (1 M NaCl, 2.5 mM Tris-HCl, 0.25 mM EDTA, pH 8). Le tampon est remplacé et la dialyse se poursuit durant 4 heures à 4°C.

9.3) Ligation:

Cette ligation s'effectue en mélangeant l'ADN digéré et dialysé (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) avec le tampon de ligation (1 M Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl_2 , 100 mM DTT) (1/10

du volume total), l'ATP 5 mM (1/10 du volume total), la T4 DNA ligase (20 unités) et de l'eau distillée pour compléter. On incube à 16°C pour une nuit.

9.4) Transformation des bactéries DH5α:

a) Préparation des bactéries compétentes:

Cinq ml de milieu LB (10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l NaCl) sont inoculés avec une colonie de E. coli DH5α et incubés à 37°C avec agitation pendant 2 heures ($D.O_{550}=0.3$). A partir de cette culture, nous faisons une sous-culture 1/20 dans 100 ml de LB qu'on laisse à 37°C pour un autre 2 heures ou jusqu'à ce que la $D.O_{550}=0.48$. On refroidit les bactéries 5 minutes sur glace avant de les centrifuger 15 minutes à 3000 rpm. Le culot est resuspendu dans 40 ml de TFB I (30 mM potassium acétate, 100 mM $RbCl_2$, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 15% glycérol) et laissé sur glace 5 minutes avant d'être recentrifugé. Le culot de bactéries est resuspendu dans 4 ml de TFB II (10 mM POPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, 15% glycérol), incubé 15 minutes sur glace et aliquoté dans des microtubes à raison de 200 µl/tube avant d'être congelé à -70°C.

b) Transformation:

Les bactéries compétentes DH5α (200 µl), une fois dégelées, sont gardées sur glace 10 minutes avant d'ajouter l'ADN (produit de la ligation) (maximum de 50 ng pour 200 µl de cellules). On incube les tubes sur glace 30 minutes suivi d'un choc de 90

secondes à 42°C. Après avoir laissé les tubes 1 à 2 minutes sur glace, 0.8 ml de milieu LB est ajouté et on incube 1 heure à 37°C avant d'étaler le tout sur un pétri LB + 1.5% Agar + Kanamycine (25 µg/ml). Les pétris sont incubés à 37°C, à l'envers toute une nuit.

9.5) Extraction de l'ADN plasmidique:

Cette extraction se fait selon la méthode de lyse alcaline décrite par Sambrook et al. pp. 1.25 à 1.28 (1989). L'on précipite dans 2 1/2 volume d'éthanol à -20°C toute la nuit ou à -80°C 1 heure, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 4°C et le culot est resuspendu dans le tampon TE.

10) PRÉPARATION DES SONDES

10.1) Amplification et purification des plasmides:

L'amplification des plasmides est réalisée selon la méthode "Amplification en milieu riche" décrite par Maniatis et al. p. 88 (1982). Les plasmides sont extraits selon la méthode de lyse alcaline telle que décrite à la section 9.5.

10.2) Description des sondes (Digestion enzymatique des plasmides):

Les enzymes de restriction sont utilisés tels que décrit par la compagnie Pharmacia.

a) Sonde E7

La sonde E7 provient du plasmide pD7 (Marshall et al., 1989) qui est constitué d'un fragment de 3833pb (base 501 à 4334) de HPV-16 ligué à un fragment HindIII-EcoRI de 2818pb du plasmide pSV2-Néo (contenant le promoteur de SV40 et une partie de pBR322). Il est digéré par PstI et le fragment de 132pb est isolé par élution (voir section 10.3). Cette sonde est spécifique à la région E7 de HPV-16.

b) Sonde GapDH

Le plasmide pGEM3 transporte le c-DNA du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de rat (GapDH) ce qui nous permet, par une digestion du plasmide par PstI, d'isoler une sonde de 1.4Kb (par élution) spécifique au GapDH. Ce plasmide nous a été fourni par Edward B. Ziff du New York University Medical Center.

c) Sonde Néo

La sonde Néo résulte du gène Néo du plasmide pN2. Il s'agit d'un vecteur rétroviral contenant les LTRs et 418pb de séquences codantes du gène gag de MoMLV ainsi que le gène Néo de Tn5, qui nous a été fourni par Eli Gilboa. Pour une description

plus détaillée de ce vecteur voir Armentano et al. (1987). Le plasmide pN2 est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI et le fragment de 1.5Kb (Néo) est lui aussi élué selon la méthode décrite à la section 10.3.

d) Sonde LTR

Elle provient également d'une digestion du plasmide pN2 par EcoRI. Pour cette sonde c'est le fragment de 0.9Kb qui est élué.

10.3) Électrophorèse et élution d'une bande d'un gel d'agarose

Les échantillons de plasmides digérés sont lyophilisés jusqu'à ce que leur volume soit d'environ 20-25 µl. On y ajoute 1/5 de volume de tampon de dépôt (voir section 8.3). L'électrophorèse s'effectue telle que mentionné précédemment à la section 8.3.

Après photographie du gel, la bande d'ADN désirée est découpée à l'aide d'un scalpel. Le fragment qui nous intéresse est ensuite élué du gel en utilisant le système "Band Prep" de Pharmacia selon les directives fournies.

La concentration des fragments élués est déterminée sur pètri de bromure d'éthidium (voir section 8.1).

10.4) Préparation des sondes radioactives:

Les différentes sondes (inserts) utilisées sont marquées au [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham) selon le système de marquage à amorces multiples ("multiprime DNA labelling systems") distribué par Amersham. De 25 à 30ng d'ADN sont utilisés.

La sonde ainsi marquée est d'abord dénaturée 2 minutes à 100°C avant son incorporation à la solution d'hybridation.

11) PCR

11.1) Oligonucléotides:

Nous avons utilisé 3 séries d'oligonucléotides lors de notre étude. La première série fut utilisée pour amplifier la région enhancer/empaquetage de E1a d'Ad2 (des nucléotides 186 à 380) dans nos différentes lignées cellulaires. Il s'agit de P.Ad.186 et P.Ad.380, tous deux de 20 mers.

P.Ad.186: 5' CCGGTGTATACGGGAAGTGA 3'

P.Ad.380: 5' TCCACGTAAACGGTCAAAGT 3'

La deuxième série est utilisée pour l'amplification de la séquence cellulaire (1.5Kb) de pG2SVx-Bam4 et se situe dans la partie U5 du LTR (DR.LTRU5 (20 mers)) et dans la partie du site d'épissage 3' (DR.3'SS (20 mers)) du M-MuLV. Ces oligonucléotides sont également utilisés pour le séquençage d'une partie de la séquence cellulaire de pG2SVx-Bam4.

DR.LTRU5: 5' CTCCTCTGAGTGATTGACTA 3'

DR.3'SS: 5' AGGGAAGTTTACAAGGGGCG 3'

La dernière série d'oligonucléotides sert à amplifier 0.8Kb de la séquence cellulaire de pG2SVx-Bam4. Ils se trouvent dans l'ADN cellulaire (partie séquencée à l'aide des oligonucléotides précédents).

JCD.3': 5' ACCAGCGTTTCTGGGTGAGC 3'

JCD.5': 5' TCAAGGAAGCCAATGTAAC 3'

11.2) Réaction:

Les réactions de PCR (Polymerase Chain Reaction) sont effectuées dans un volume total de 100 µl contenant: 80 mM Tris-HCl (pH 9.0), 20 mM (NH₄)SO₄, 2 mM MgCl₂, 2.5 pM de chaque dNTP, 100 ng d'ADN, 20 mM de l'oligonucléotide 5', 20 mM de l'oligo 3' et 0.5U de Taq DNA polymérase (Pharmacia) ou PfuI polymérase (Stratagene). Les échantillons sont placés dans le four Thermolyne de la compagnie Biotherm.

Ils sont chauffés 1 minute à 95°C avant de subir 30 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 50°C et 2.5 minutes à 72°C suivit d'un cycle de 5 minutes à 72°C.

Le cinquième du volume total des échantillons (soit 20 µl) est déposé sur gel d'agarose 2% ou 1% agarose + 2% agarose NuSieve, selon la méthode décrite à la section 8.3, pour visualiser les produits de PCR.

11.3) Clonage des produits de PCR:

Les produits de PCR (0.8Kb et 1.5Kb cellulaire) sont clonés dans le vecteur pCR-1000 (50 ng) de la compagnie Invitrogene tel que suggéré par le distributeur. En résumé, la ligation du produit de PCR et du vecteur pCR-1000 est utilisée pour transformer des bactéries compétentes DH5α qui sont étalées sur des pétris contenant du X-gal et l'antibiotique Ampiciline (50 µg/ml).

Après une incubation d'une nuit, les colonies blanches sont piquées et l'ADN plasmidique, isolé par la méthode de lyse alcaline (section 9.5), est analysé par digestion à l'aide d'enzymes de restriction pour déterminer s'il s'agit bien du vecteur pCR-1000 contenant le produit de PCR que l'on voulait cloner.

12) SÉQUENÇAGE

Les réactions de séquence se font à partir de l'ADN double brin en utilisant la trousse de séquençage T7 ("T7 Sequencing Kit") de la compagnie Pharmacia tel que suggéré dans le livret d'instruction. L'isotope [α - ^{35}S]dATP (Amersham) est utilisé.

Les électrophorèses s'effectuent sur le système "MacroPhor" de Pharmacia LKB, selon les recommandations suggérées dans le manuel d'instruction. De 3 à 5 μl de chaque réaction (préalablement dénaturés 5 minutes à 95°C) sont déposés sur le gel d'acrylamide-urée 6% et migrés de 1 à 4 heures à 22 mA. Le gel est trempé 20 minutes dans une solution 10% acide acétique/10% méthanol et séché à l'aide de séchoirs. Il est, par la suite, exposé une nuit (ou plus) sur un film XRP-1 de Kodak.

RÉSULTATS

Les lignées cellulaires G2 et G4F sont nommées lignées révertantes car elles ont perdu des propriétés biologiques caractéristiques de la lignée parentale transformée par Ad2, F4 (déjà bien caractérisée (Gallimore et al., 1977)).

Ces lignées sont maintenant de morphologie de type fibroblastique, non-tumorigéniques chez des souris nues (athymiques) et ont perdu la propriété d'indépendance d'ancrage (croissance réduite en agar mou par rapport aux cellules F4).

Le tableau 1 dresse un portrait des différentes lignées cellulaires utilisées au cours de cette étude, obtenues à partir des cellules F4.

1) LE GÈNE SUPPRESSEUR EST-IL SPÉCIFIQUE AUX ONCOGÈNES

ADÉNOVIRAUX? (i.e: E1)

La lignée révertante G2 exprime toujours les gènes transformants E1a et E1b d'adénovirus (déterminé par immunoprécipitation) et est résistante à la retransformation par ces mêmes gènes (Sircar et al., 1987). La présence du gène E1 d'Ad2 dans les cellules G2 et F4 a également été déterminée par la méthode de PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques à la région E1 (voir section 3.3). De plus, des

TABLEAU 1

Propriétés des différentes lignées cellulaires utilisées, obtenues à partir de F4.

Lignée cellulaire	Croissance en agar mou (0.33%)	Tumorigénicité dans les souris nues (Tumeurs / sites)	État E1A		Type de morphologie ⁽³⁾
			gène	protéine	
F4 ⁽¹⁾	+	24/27	+	+	T
G2 ⁽¹⁾	-	0/30	+	+	F
G4F ⁽²⁾	-	0/9	-	-	F
T-G ₂ SVx	ND ⁽⁴⁾		+	+	T
G ₂ N ₂	ND ⁽⁴⁾		+	+	T

(1) Résultats tirés de Rodrigues et al., 1987

(2) Résultats tirés de Weber et al., 1988

(3) T, transformé. F, fibroblastique

(4) ND, non déterminé

cellules hybrides entre G2 et F4 sont non-transformées (Weber et al., 1991) ce qui nous indique qu'elles expriment un phénotype de suppresseur de tumeur dominant. Toutefois, il y a retransformation des cellules G2 par des oncogènes hétérologues tels que c-myc, N-ras et moyen T de polyome (Sircar et al., 1988).

Trois familles de virus semblent transformer les cellules via un mécanisme commun de séquestration du produit du gène Rb (Rb-105 antioncoprotéine) soient les adénovirus, les papovavirus et les papillomavirus (Whyte et al., 1988; DeCaprio et al., 1988; Dyson et al., 1989). Ceci suggère que notre révertant résistant à la retransformation par E1a, pourrait aussi être résistant à d'autres membres de cette famille d'oncogènes capables de lier Rb. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé l'antigène (Ag) SV40-T ainsi que l'oncogène E7 de HPV16, pour transfecter nos cellules révertantes.

La lignée cellulaire G4F (Weber et al., 1990; Dion et al., 1992) (ayant perdu le gène E1 d'Ad) est utilisée comme contrôle. Ainsi, s'il y a transformation de ces cellules, ce sera seulement dû à l'oncogène transfecté lui-même et non au gène transformant d'adénovirus.

Les cellules G2 et G4F sont cotransfectées avec un plasmide contenant le gène de résistance au G-418 (pSV2neo) et, selon le cas, le plasmide pnéo Δ 2005 contenant l'Ag SV40-T ou pD7 renfermant le gène E7 de HPV16. Les colonies résistantes au G-418 sont piquées et cultivées comme les lignées cellulaires normales. Les différentes lignées cellulaires obtenues sont inscrites dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Transformation des cellules révertantes G2 et des cellules contrôle G4F avec les oncogènes SV40-T et HPV16-E7.

Oncogène Transfecté ^a	Cellule Transfectée	Lignée cellulaire obtenue ^b	CFE ^c (%)	Expression de SV40-T ou de E7 ^d	Tumorigénicité dans les souris nues	
					Tumeurs / site	Nombre de jours sans tumeurs ^e
-	-	F4	59.5	-	24/27	20
-	-	G2	3.0	-	0/69	120
-	-	G4F	1.3	-	0/39	60
SV40-T	G2	P1C1	37.5	++	2/9	45
SV40-T	G2	P4C5	33.5	++	2/9	56
SV40-T	G2	P1C4	28.0	++	1/9	60
SV40-T	G2	P2C2	18.0	+	0/9	80
SV40-T	G2	P6C2	18.0	+	0/9	90
SV40-T	G2	P7C1	15.5	-	ND	ND
SV40-T	G2	P5C5	13.4	-	0/9	90
SV40-T	G2	P1C7	11.2	-	0/9	90
SV40-T	G4F	P2C5	27.0	++	1/9	48
SV40-T	G4F	P1C1	26.5	+	1/9	38
SV40-T	G4F	P2C3	26.6	+	1/9	51
SV40-T	G4F	P4C5	14.0	±	0/9	100
SV40-T	G4F	P4C1	7.0	-	ND	ND
HPV16-E7	G2	P1C3	19.0	++	1/9	49
HPV16-E7	G2	P5C3	18.5	++	1/9	49
HPV16-E7	G2	P9C1	18.0	++	1/9	37
HPV16-E7	G2	P1C4	15.5	+	0/9	65
HPV16-E7	G2	P2C3	14.5	+	0/9	90
HPV16-E7	G2	P3C3	12.7	+	0/9	51
HPV16-E7	G2	P2C4	7.0	+	0/9	49
HPV16-E7	G2	P7C4	6.0	++	0/9	60
HPV16-E7	G4F	P2C3	18.5	ND	1/9	49
HPV16-E7	G4F	P2C5	18.0	ND	1/9	49
HPV16-E7	G4F	P2C7	16.7	ND	0/9	51
HPV16-E7	G4F	P3C5	16.5	+	0/9	67
HPV16-E7	G4F	P3C2	13.5	+	0/9	120
HPV16-E7	G4F	P1C5	13.2	+	0/9	49
HPV16-E7	G4F	P1C4	11.2	+	0/9	110
HPV16-E7	G4F	P4C1	6.5	ND	0/9	49

^a Le plasmide Δ2005 portant les gènes SV40-T et néo fut utilisé. HPV16-E7 était porté sur le plasmide pD7.

^b P désigne le pétri et C le clone piqué des transfectants résistant au G-418.

^c Efficacité de formation de colonie en agar mou (0.33%).

^d Quantité relative estimée à partir de l'immunoprécipitation (SV40-T) ou du dot blot (HPV16-E7).

^e Désigne le jour de la première observation de tumeur ou, en l'absence de tumeur, la durée de l'observation des souris avant leur décès.

1.1) Expression de la protéine SV40-T

Afin de vérifier si les lignées cellulaires transfectées expriment la protéine SV40-T, on utilise la méthode d'immunoprécipitation à l'aide d'un sérum anti-T. Les 8 lignées cellulaires obtenues par transfection des cellules G2 par SV40-T et les 5 obtenues pour les cellules G4F, ont été immunoprécipitées. On constate qu'il y a expression (immunoprécipitation) de l'Ag SV40-T (protéine de 90Kd) dans 5 des 8 lignées cellulaires dérivées de G2 ainsi que dans 4 des 5 lignées cellulaires dérivées de G4F. Dans le cas de P2C2, P6C2 et P2C5 l'expression semble moins importante (Figure 5). La quantité relative de protéine précipitée est rapportée dans le tableau 2.

1.2) Expression de HPV16-E7

Pour ce qui est de la protéine E7, il n'a pas été possible de déterminer son expression adéquatement par immunoprécipitation à l'aide de l'antisérum E7 que l'on possédait parce que la quantité de protéines E7 est faible, ce qui la rend difficilement détectable par cette méthode. Nous avons donc utilisé la méthode de dot blot à partir de l'ARN cytoplasmique des cellules transfectées par E7, que nous avons hybridé avec une sonde spécifique à E7 dérivée du plasmide pD7. Une sonde GapDH a également été utilisée pour normaliser la quantité d'ARN déposée sur le filtre. Le gène GapDH est utilisé pour l'entretien cellulaire ("house keeping gene") et par conséquent est exprimé à un taux équivalent d'une cellule à l'autre. De plus, l'expression de ce gène n'est pas

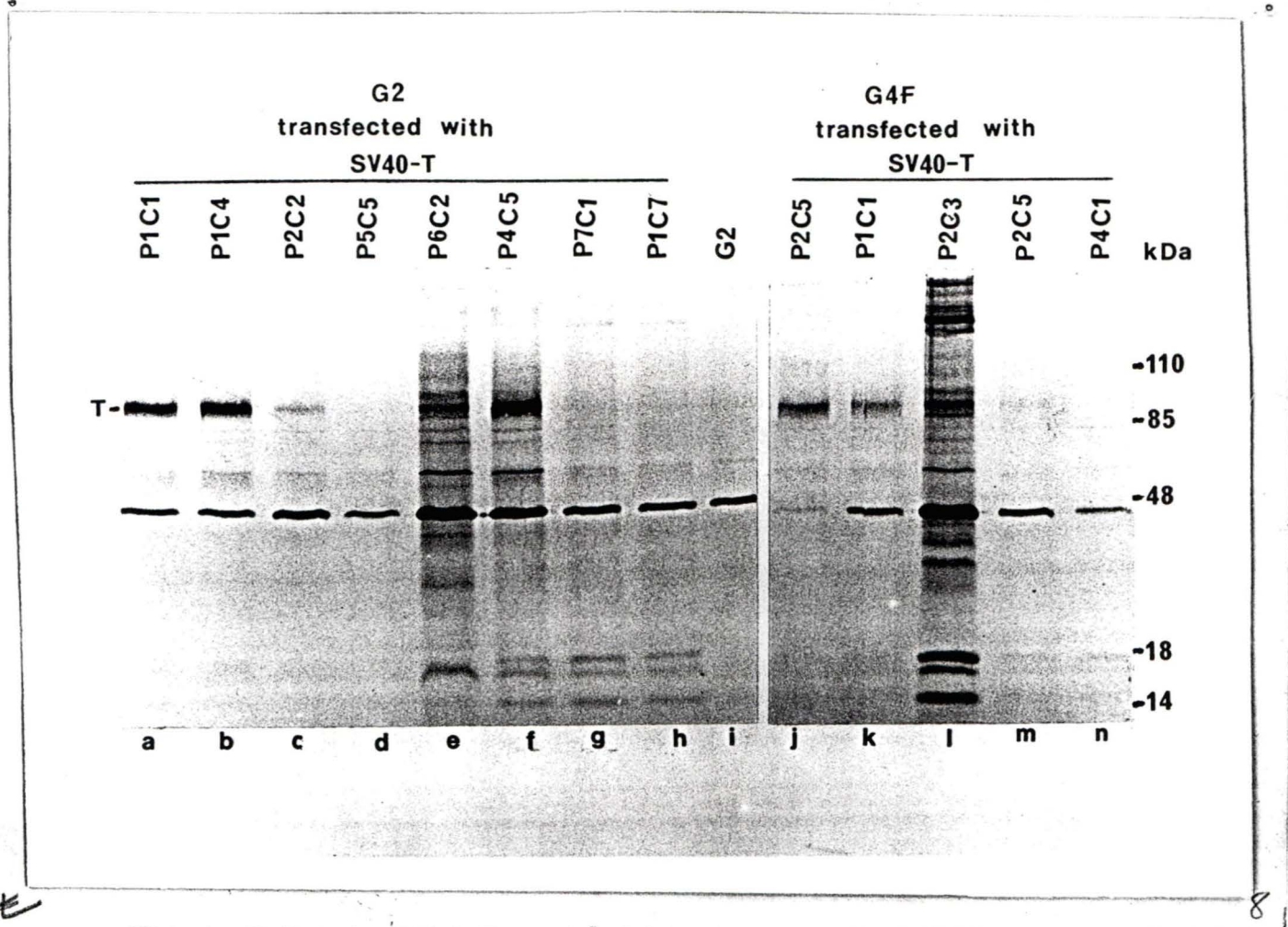


Figure 5: Immunoprécipitation de l'Ag grand T de SV40 des lignées cellulaires révertantes G2 et G4F transfectées avec le plasmide pneoΔ2005.

Les différentes cellules obtenues après transfection sont marquées pendant 2 heures à la méthionine [^{35}S] et le "lysate" est précipité avec un sérum anti-T de SV40. Les complexes de protéines sont séparés par électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide 12 % et détecté par autoradiogramme. Les cellules révertantes G2 (E1a⁺) et G4F (E1a⁺) sont dérivées de la lignée cellulaire transformée par Ad2, F4. La bande correspondant à l'antigène SV40-T de 90 KDa est indiquée par un T. Les cellules G2 non transfectées sont utilisées comme contrôle négatif (ligne i).

influencée par la transformation par l'adénovirus (communication de Ed Ziff). Grâce à cette sonde, on peut démontrer que l'ARN sur le filtre est présent en quantité égale dans tous les cas et, dans l'éventualité d'un résultat négatif obtenu avec la sonde E7, nous montre que l'ARN était bien présent. Le résultat du dot blot est illustré à la figure 6 et la quantité relative estimée est reportée dans le tableau 2.

Les 8 lignées cellulaires dérivées de G2, et 4 des 8 lignées dérivées de G4F sont déposées sur le dot blot. Dans tous les cas, il y a expression, plus ou moins forte, de l'oncogène E7. Une petite quantité de la sonde E7 non-marquée est aussi déposée sur le filtre comme contrôle positif (pour vérifier la sonde). L'ARN des cellules G2 et G4F non transfecté est également déposé comme contrôle négatif, ces cellules ne contenant pas le gène E7.

1.3) Propriétés des cellules transfectées

Nous avons également voulu vérifier si ces cellules transfectées et exprimant la protéine E7 ou SV40-T, selon le cas, avaient des propriétés de cellules transformées. L'efficacité de croissance en agar mou ainsi que la tumorigénicité dans les souris nues ont donc été vérifiées.

Les souris injectées de façon sous-cutané avec 3×10^5 cellules ont été observées durant 120 jours au maximum pour noter l'apparition de tumeurs aux sites

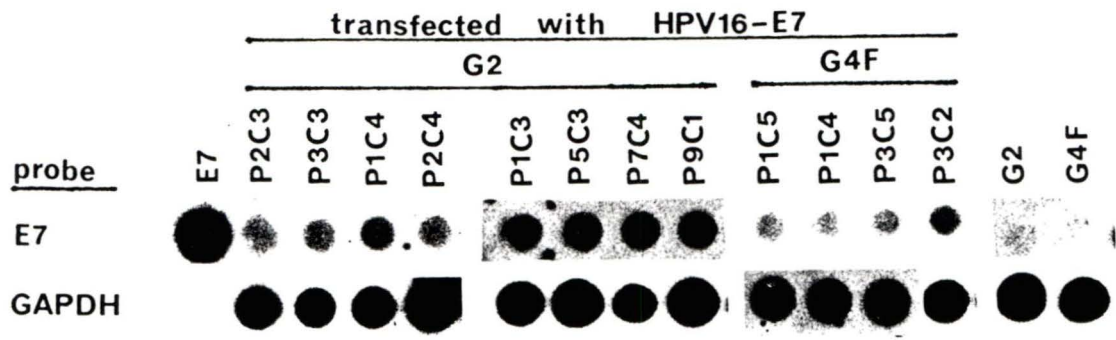


Figure 6: Expression de l'oncogène E7 dans les cellules révertantes transfectées avec le plasmide pD7.

Dot blot de l'ARN cytoplasmique des lignées cellulaires obtenues par transfection des cellules révertantes G2 et G4F par HPV16-E7. Les échantillons d'ARN sont déposés sur 2 filtres et hybridés avec une ou l'autre des sondes suivantes marquées au ^{32}P : E7 (sonde spécifique à l'oncogène E7 (panneau du haut)) ou GAPDH "house keeping gene" comme contrôle (panneau du bas). L'ADN de E7 est également déposé sur le dot blot, nous servant de contrôle positif pour la sonde E7 et négatif pour la sonde GAPDH. L'ARN des cellules G2 et G4F servent de contrôle positif pour la sonde GAPDH et de contrôle négatif pour la sonde E7.

d'injections. Les résultats sont reportés dans les 2 dernières colonnes du tableau 2. La 6^e colonne nous donne la quantité de tumeurs observées par rapport au nombre de sites d'injection. La dernière colonne quant à elle présente le nombre de jours qui se sont écoulés avant l'apparition de tumeurs, ou dans le cas où il n'y a pas eu de tumeur, le nombre de jours précédant la mort par euthanasie de la souris. La croissance en agar mou est exprimée en pourcentage.

Il semble y avoir une corrélation entre l'expression de l'oncogène transfecté et la transformation de la lignée cellulaire. En effet les lignées cellulaires exprimant le plus haut niveau de l'antigène SV40-T ou d'ARN de HPV16-E7 poussent mieux en agar mou et peuvent induire des tumeurs chez les souris nues.

La moyenne de l'efficacité de formation de colonie en agar mou est semblable chez les cellules G2 et les cellules G4F utilisées comme contrôle. La moyenne est de 21.89% pour les transfectants G2 et de 20.22% pour les transfectants G4F par SV40-T et de 13.9% pour G2 et de 14.26% pour G4F transfecté par E7.

L'utilisation de la lignée G4F comme témoin nous permet de contrôler la différence dans l'efficacité de transformation des plasmides p Δ 2005 (SV40-T Ag) et pD7 (HPV16-E7) qui pourrait résulter d'une inégalité dans l'efficacité des promoteurs. Toutefois les résultats obtenus nous permettent d'affirmer que l'efficacité de transformation des 2 plasmides est semblable.

À la lumière de ces résultats, on constate que nos deux révertants (G2 et G4F) transfectés ont une tumorigénicité similaire. Ce qui nous permet de conclure que la lignée cellulaire G2 n'est pas résistante à la transformation par la famille des oncogènes capables de lier Rb tels que SV40-T et HPV16-E7, comme nous l'avions pensé.

2) LE GÈNE SUPPRESSEUR EST-IL SPÉCIFIQUE À L'ESPÈCE?

Il a déjà été démontré, dans notre laboratoire, que des hybrides entre les révertants G2 et les cellules parentales F4 étaient non-tumorigéniques (Weber et al., 1991). Ce qui signifie que le phénotype des cellules révertantes est dominant puisqu'il peut empêcher l'expression du phénotype transformé des cellules F4.

On s'est alors demandé si le phénotype suppresseur de transformation spécifique à E1 dans les cellules G2, était aussi fonctionnel dans les cellules d'autres espèces que le rat (i.e. dans des cellules hétérologues). Nous avons choisi, pour cette étude, les cellules humaines 293 qui sont transformées par le gène E1 d'adénovirus 5. Elles poussent bien en agar mou mais démontrent une faible tumorigénicité.

Nous avons donc fabriqué des hybrides entre les cellules de rat G2 et les cellules humaines 293. Les 2 types cellulaires ont été transfectés par un plasmide portant un gène de résistance à un antibiotique différent pour nous permettre de sélectionner les

hybrides. Ainsi les cellules G2 portent un marqueur de résistance à l'hygromycine B tandis que les cellules 293 portent le gène de résistance au G-418 (gène néo).

Les cellules sont fusionnées à l'aide du polyéthylène-glycol et les hybrides G2 x 293 sont sélectionnés grâce aux 2 antibiotiques (hygromycine B et G-418). On a retenu 7 hybrides qui furent nommés H5, H6, H7, H8, H9, H10, H12. Pour vérifier qu'il s'agit bien d'hybrides G2 x 293, un compte chromosomique est effectué chez les hybrides et les cellules parentales (tableau 3).

De plus, nous avons déterminé d'autres propriétés de ces hybrides et des deux cellules parentales (en comparaison), soient: la présence des protéines E1a, la croissance en agar mou et la tumorigénicité. Tous ces résultats sont reportés dans le tableau 3.

2.1) Expression de E1a

Pour déterminer la présence de la protéine E1a nous utilisons la méthode d'immunoprécipitation avec un anti-sérum E1a (Figure 7). Cette dernière expérience confirme la présence de E1a (protéines de 35 à 55 Kd) dans les cellules parentales G2 et 293 mais également dans les hybrides. De plus, on constate qu'il y a coprécipitation des protéines 300K et p105-Rb dans les hybrides. La piste G de la figure 7 correspond aux cellules G4F (ayant perdu le gène E1) et nous sert de contrôle négatif tandis que la

TABLEAU 3

Propriétés des lignées cellulaires hybrides obtenues par fusion des cellules révertantes G2 avec les cellules humaines transformées par Ad5, 293.

Lignée cellulaire	Compte chromosomique ^a	Protéine E1a ^b	CFE ^c (%)	Tumeurs / sites ^d	
				Exp. A	Exp. B
<u>Parentales</u>					
293	42 ± 5	+	38.3	3/27	5/24
G2	60 ± 9	+	3.0	0/69	0/18
<u>Hybrides</u>					
H5	112 ± 8	+	8.4	0/9	0/9
H6	120 ± 5	+	7.5	0/9	0/9
H7	110 ± 12	+	8.5	0/9	0/9
H8	113 ± 8	+	13.5	0/9	ND
H9	ND ^e	ND	15.8	0/9	0/9
H10	105 ± 7	+	32.6	0/9	ND
H12	116 ± 11	+	8.5	0/9	ND

^a Moyenne de 20 métaphases ± déviation standard.

^b Déterminé par immunoprécipitation tel que décrit dans la section matériels et méthodes.

^c Efficacité de formation de colonies en agar mou 0.33% (Colony Formation Efficiency).

^d Injection sous cutanée, à 3 sites différents, à des souris athymiques Balb/c nu/nu.

Exp. A: Injection de 3×10^5 cellules

Exp. B: Injection de 2×10^6 cellules

^e ND = Non Déterminé

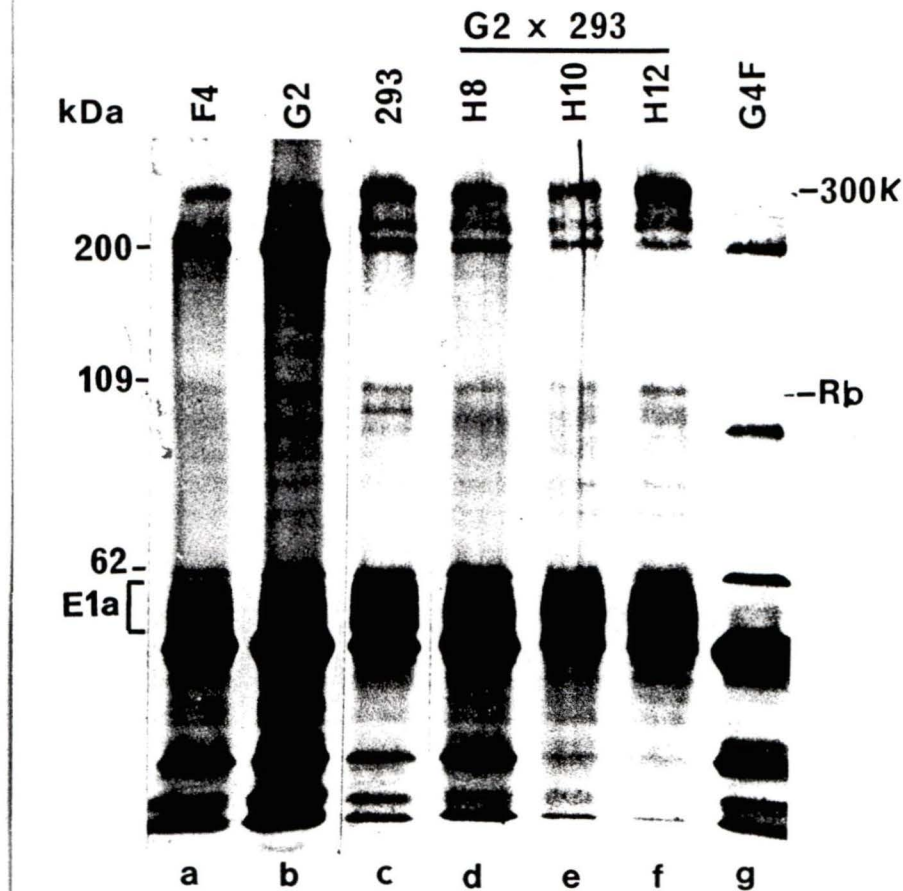


Figure 7: Immunoprécipitation de la protéine E1a des cellules transformées (F4 et 293), révertantes (G2 et G4F) et hybrides (H8, H10, H12).

Les cellules sont marquées métaboliquement à l'aide de la méthionine [^{35}S] et le lysat est précipité avec un sérum anti-E1a. Les complexes protéiques sont séparés par électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide 9% et détectés par autoradiographie. Les 3 lignées cellulaires hybrides, H8, H10 et H12, proviennent de la fusion des cellules G2 et 293.

piste A (cellules F4) sert de contrôle positif. Ainsi la protéine E1a lie Rb et 300k dans les hybrides tout comme chez les cellules G2.

2.2) Efficacité de formation de colonies en agar mou (CFE)

Nous savons déjà que la lignée parentale 293 possède une grande capacité de formation de colonies en agar mou (38.3%), tandis que les G2 n'ont qu'un faible pourcentage (3.0%). Les 2 types cellulaires composant les hybrides se complètent l'un l'autre en ce qui concerne la croissance en agar mou.

Ainsi, le grand pourcentage des cellules 293 est beaucoup diminué chez les différents hybrides et passe à un niveau intermédiaire entre les cellules 293 et les cellules G2. Cette CFE varie entre 7.5% et 32.6% selon les hybrides (voir tableau 3) avec une moyenne de 13.5%.

2.3) Tumorigénicité

Pour cette étude des souris nues athymiques (Balb/c athymic nu/nu mice) sont injectées avec 3×10^5 cellules (exp. A , Tableau 3) de façon sous-cutané à 3 sites différents par souris. L'observation des souris s'est effectuée sur une période de 120 jours pour noter l'apparition de tumeurs aux sites d'injection.

Trois tumeurs sur 27 sites d'injection ont été observées pour les cellules 293 mais aucune n'a été signalée sur les 63 sites d'injection des différents hybrides pendant ces 120 jours.

Comme on sait que les cellules 293 ont un pouvoir tumorigénique faible (Graham, 1987), on a réalisé une deuxième série d'expériences en utilisant 10 fois plus de cellules soit 2×10^6 cellules/injection, pour augmenter la possibilité d'obtenir des tumeurs. On a ainsi obtenu 5 tumeurs pour 24 sites d'injections des cellules 293 mais aucune tumeur pour 36 sites d'injections des cellules hybrides (exp. B Tableau 3).

On peut donc conclure, à partir de ces résultats, que le phénotype transformant des cellules 293 est supprimé significativement par les cellules G2 dans les hybrides G2 x 293. De plus, cette suppression n'est pas due à la perte des gènes transformants tel que démontré par immunoprécipitation.

3) PEUT-IL Y AVOIR RÉVERSION CHEZ LES CELLULES G2 PAR MUTAGÉNÈSE D'INSERTION RÉTROVIRALE?

Cette expérience est possible du fait qu'aucune retransformation spontanée n'a été observée chez les cellules G2. Si nous inactivons le gène suppresseur dominant des cellules G2 par l'insertion d'un rétrovirus, il serait possible d'observer des foyers de

cellules transformées parmi les cellules G2. De plus, si l'intégration se produit près du gène suppresseur, il pourra nous servir de marqueur subséquent pour l'éventuel clonage de ce gène suppresseur.

Les premières expériences de mutagénèse d'insertion à l'aide de rétrovirus furent rapportées en 1985 (King et al., 1985; Frankel et al., 1985). Pour notre expérience nous avons besoin d'un rétrovirus défectif dans la réplication pour qu'il s'intègre à un site unique et de façon stable dans l'ADN cellulaire et défectif dans la transformation. Il doit de plus, posséder un marqueur de sélection dominant tel que Néo^r.

Le premier rétrovirus à être utilisé avec succès dans notre laboratoire, pour infecter les cellules G2 fut N2, une construction dérivant du MoMLV (Moloney murine leukemia virus) contenant le gène néo (Armentano et al., 1987). Ce dernier a déjà été utilisé par différents groupes avec succès pour le transfert de gène *in vitro*. Il a été choisi car il croît à un haut titre et ne contient aucun oncogène donc, ne transforme pas par lui-même. Plusieurs lignées cellulaires retransformées par l'intégration de N2 ont été isolées (G2N2) (Weber et al., 1991).

Nous avons voulu vérifier si la réversion des cellules G2 par mutagénèse d'insertion rétrovirale était unique à N2 ou si elle pouvait également être observée en utilisant un autre rétrovirus. Le rétrovirus ZipNéoSV(x) dérivé lui aussi du MoMLV (Cepko, et al., 1984) et portant le gène néo^r a été utilisé (pour une description plus

détaillée voir matériel et méthodes, Figure 4). Il ne contient aucun oncogène et ne peut donc pas transformer les cellules par lui-même. Ce qui a d'ailleurs été vérifié en infectant les cellules G4F par ce virus comme contrôle. Il n'y a eu aucune retransformation.

De plus, ce virus possède un avantage de plus que le N2, en nous offrant une 2^{ème} stratégie de clonage du gène suppresseur. En effet, étant donné qu'il possède l'origine de répllication SV40 et celle de pBR322 cela lui permet de pouvoir se répliquer autant dans les cellules eucaryotes que procaryotes. Nous en reparlerons un peu plus loin. Toutefois le rétrovirus ZipNéoSV(x) possède une faible efficacité d'infection en comparaison du rétrovirus N2.

3.1) Mutagenèse d'insertion rétrovirale avec ZipNéoSV(x)

Après infection de la lignée cellulaire G2 par le virus ZipNéoSV(x), 6 clones indépendants résistants au G-418 ont été isolés. Ils ont tous été injectés à des souris nues pour tester leur tumorigénicité et l'observation s'est poursuivie durant 120 jours. Un seul de ces 6 clones a donné naissance à une tumeur (1 tumeur / 9 sites d'injection des 6 clones). Cette lignée cellulaire se nomme T-G2SVx et est utilisée pour les études ultérieures. Il est bon de mentionner que cette lignée (ainsi que G2N2) possède toujours le gène E1 (voir section 3.3) et que celui-ci est fonctionnel.

Les cellules G4F et FR3T3 ont aussi été infectées par ZipNéoSV(x) et N2

de la même manière et ni l'une ou l'autre lignée n'a été retransformée. C'est donc dire que la retransformation et la tumorigénicité semblent être des propriétés spécifiques aux cellules G2 infectées par N2 et ZipNéoSV(x).

La retransformation des cellules G2 par l'insertion rétrovirale pourrait-être due soit à:

- 1) l'activation d'un oncogène cellulaire (Peters, 1990);

ou:

- 2) l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (l'insertion s'est fait soit directement à l'intérieur du gène suppresseur et empêche son expression ou affecte peut-être un enhancer empêchant l'action du suppresseur).

La première possibilité est peu probable car l'insertion de N2 et de ZipNéoSV(x) transforme seulement les cellules G2 et non pas G4F (qui est très près de G2) ni FR3T3. Ainsi, puisqu'il n'y a pas retransformation des cellules utilisées comme contrôles (G4F et FR3T3) par l'insertion rétrovirale, on croit que la retransformation des cellules G2 est le résultat de l'inactivation d'un gène suppresseur, plutôt que l'activation d'un oncogène cellulaire.

3.2) Analyse du site d'intégration

L'analyse du site d'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) s'est fait par transfert de Southern (Figure 8). L'utilisation d'une sonde à l'intérieur du gène Néo nous

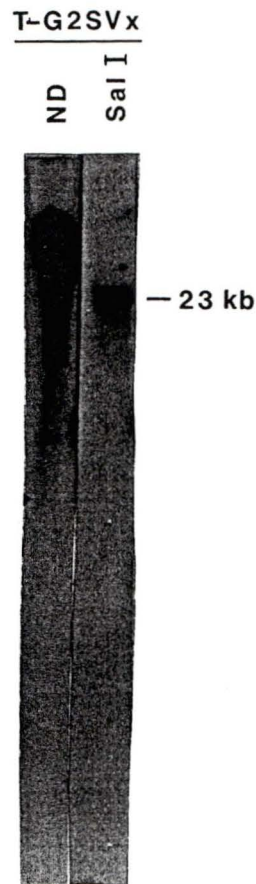


Figure 8: Analyse du site d'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans l'ADN des cellules T-G2SVx par transfert de Southern.

L'ADN génomique est digéré par SalI, séparé sur gel d'agarose 0.8%, transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde spécifique au gène Néo (1.5 Kb) marquée au ^{32}P . Le chiffre à droite représente le poids moléculaire de l'ADN en kilobase. ND = ADN génomique non-digéré.

permet de vérifier si le rétrovirus s'est intégré à un seul ou plusieurs sites dans les cellules G2.

Par l'analyse de southern de l'ADN génomique de T-G2SVx traité par SalI (cette enzyme ne coupe pas à l'intérieur du rétrovirus) et l'hybridation avec la sonde Néo (1.5Kb EcoRI fragment de N2) (Figure 8), on constate que l'intégration s'est faite à un site unique (1 fragment de 23 Kb), et que le virus intégré est encore bel et bien présent.

3.3) Présence du gène E1 dans les différentes lignées cellulaires déterminée par PCR

Les oligonucléotides P.Ad186 et P.Ad380 sont situés à l'intérieur de gène E1 d'adénovirus (position 186 et 380nt) et nous permettent donc par amplification, de déterminer si le gène E1 est toujours présent dans nos différentes lignées cellulaires (cette méthode ne nous permet cependant pas de vérifier la fonctionnalité de la région E1a qui avait d'ailleurs déjà été analysé pour la plupart de nos lignées cellulaires. Il aurait toutefois été intéressant de répéter l'expérience sur les lignées retransformées). L'amplification des ADN génomiques des cellules F4, G2, T-G2SVx et G2N2 donne un fragment de 184nt tel que prévu (Figure 9), ce qui nous donne une preuve supplémentaire du fait que E1 est toujours présent. Cependant, l'ADN des cellules G4F ne donne aucun signal de 184pb étant donné qu'il a perdu cette partie du gène de l'adénovirus (non montré). Les quelques bandes à des poids moléculaires différents de 184pb constituent des signaux non spécifiques.

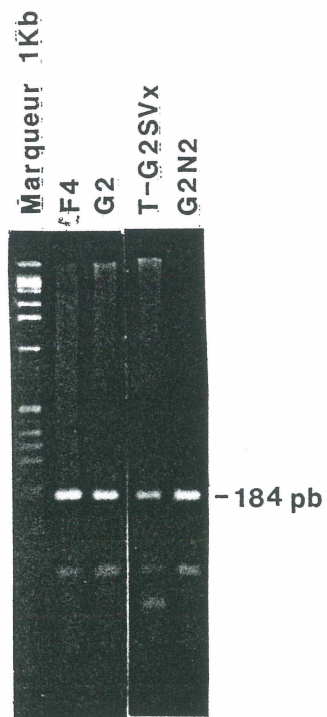


Figure 9: Détermination de la présence du gène E1a dans les cellules F4, G2, T-G2SVx et G2N2 par la technique de PCR.

Amplification d'une séquence de 184 pb à l'aide d'oligonucléotides situés à l'intérieur du gène E1a. 10% des produit du PCR ont été séparés sur un gel d'agarose 1% plus 2% de NuSieve.

4) CLONAGE DE LA JONCTION CELLULAIRE DU PROVIRUS INTÉGRÉ

ZIPNÉOSV(x)

4.1) Clonage

Si ZipNéoSV(x) s'est intégré à l'intérieur ou très près d'un suppresseur de tumeur, il est possible de cloner l'ADN cellulaire adjacent au site d'insertion rétrovirale et de l'analyser. J'ai donc voulu cloner la jonction cellulaire du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans les cellules T-G2SVx.

Pour ce faire, nous avons d'abord utilisé l'enzyme de restriction SalI qui ne coupe pas à l'intérieur du provirus intégré ZipNéoSV(x). D'après l'analyse de Southern à l'aide de la sonde néo, nous avons pu identifier un fragment de 23Kb contenant le rétrovirus (Figure 8). Nous avons donc le 5Kb du rétrovirus et 18Kb d'ADN cellulaire (Figure 10). Le fragment de 23Kb est sélectionné sur gradient de sucrose. Après ligation de ce dernier sur lui-même, il est utilisé pour transformer des bactéries Escherichia coli DH5α. Deux moyens s'offrent à nous pour sélectionner les clones contenant notre plasmide (23Kb) soit: le gène de résistance à la néomycine ne pouvant provenir que du rétrovirus (permettant une sélection à l'aide de la kanamycine), et l'origine de réplication de pBR322 permettant la réplication de l'ADN dans E. coli. Malgré plusieurs essais, aucun clone n'a été obtenu.

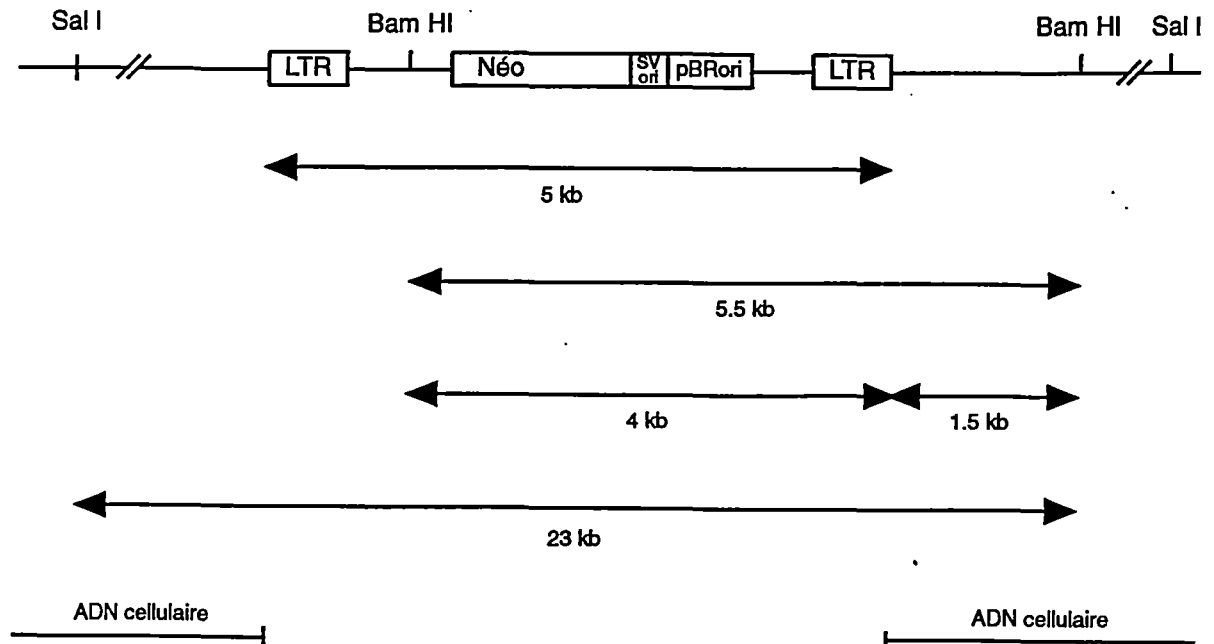


Figure 10: Stratégie de clonage des séquences flanquantes au site d'intégration du rétrovirus ZipNéoSV(x) dans les cellules T-G2SVx.

L'ADN de T-G2SVx est représenté dans le haut du schéma, les séquences entre les 2 LTRs représentant l'ADN rétroviral et les séquences flanquantes gauche et droite désignant l'ADN cellulaire. Les différents sites de restriction utilisés pour le clonage de la jonction cellulaire sont indiqués au dessus de l'ADN. La taille des différents fragments obtenus par digestion est indiquée par les flèches avec la taille correspondante en-dessous.

Nous avons donc utilisé une deuxième approche qui consiste à cloner séparément les 2 séquences flanquantes du rétrovirus intégré (gauche et droite). Pour ce faire on utilise une enzyme coupant en un site unique à l'intérieur de la séquence rétrovirale sans couper dans le gène de résistance à la néomycine ni dans les deux origines de réplication. BamHI fut utilisée pour cloner la séquence flanquante droite (Figure 10) et ClaI sera utilisée ultérieurement pour cloner la séquence flanquante gauche (fragment de 6.5Kb (Figure 11)). Le fragment BamHI de 5.5Kb (analyse de southern avec la sonde néo (Figure 11)) est purifié sur gradient de sucrose, ligué sur lui-même et utilisé pour transformer les bactéries E. coli, DH5 α . Plusieurs clones résistants à la kanamycine ont été obtenus. L'analyse de l'ADN de ces clones par digestion à l'aide d'enzyme de restriction et par des expériences d'hybridation avec les sondes Néo et LTR montre qu'il s'agit bien de l'ADN voulu (ADN rétroviral plus une partie de l'ADN cellulaire). Un clone est conservé pour les études subséquentes que l'on nomme pG2SVx-Bam4 (Figure 12).

4.2) Fabrication d'une sonde uniquement cellulaire

Le clone obtenu précédemment, pG2SVx-Bam4, contient 5Kb du vecteur rétroviral et 1Kb d'ADN cellulaire. Pour obtenir une sonde ne contenant que la séquence cellulaire la méthode de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) a été utilisée. La séquence cellulaire du clone n'étant pas connue nous devons choisir les oligonucléotides pour le PCR à l'intérieur du rétrovirus le plus près possible de l'ADN cellulaire. On utilise un

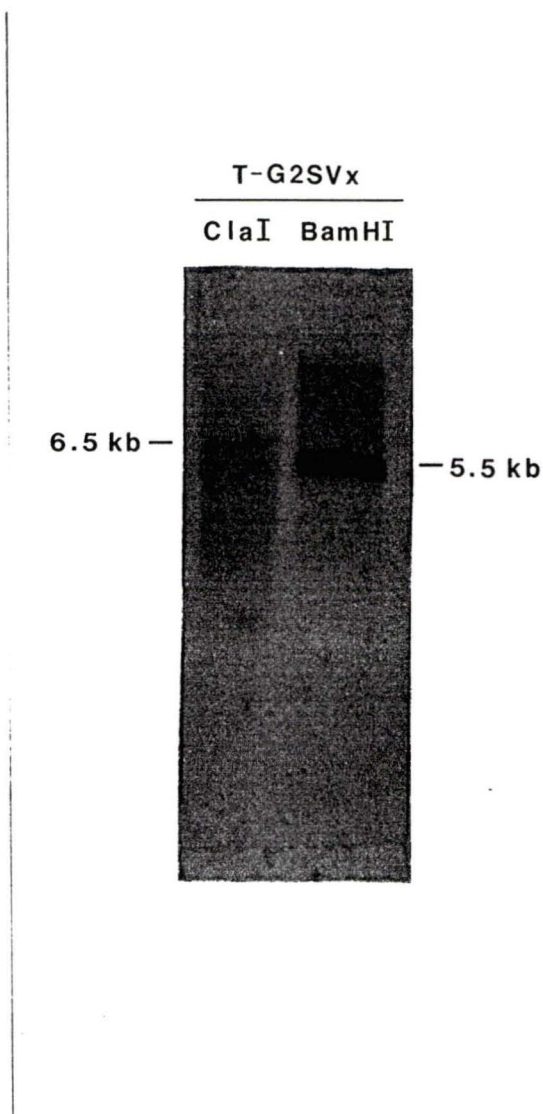


Figure 11: Analyse de Southern de l'ADN des cellules T-G2SVx digéré par ClaI et BamHI.

L'ADN génomique digéré est séparé sur gel d'agarose 0.8%, transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde Néo marquée au ^{32}P . La taille des fragments en kilobase est indiquée de part et d'autre de la figure.

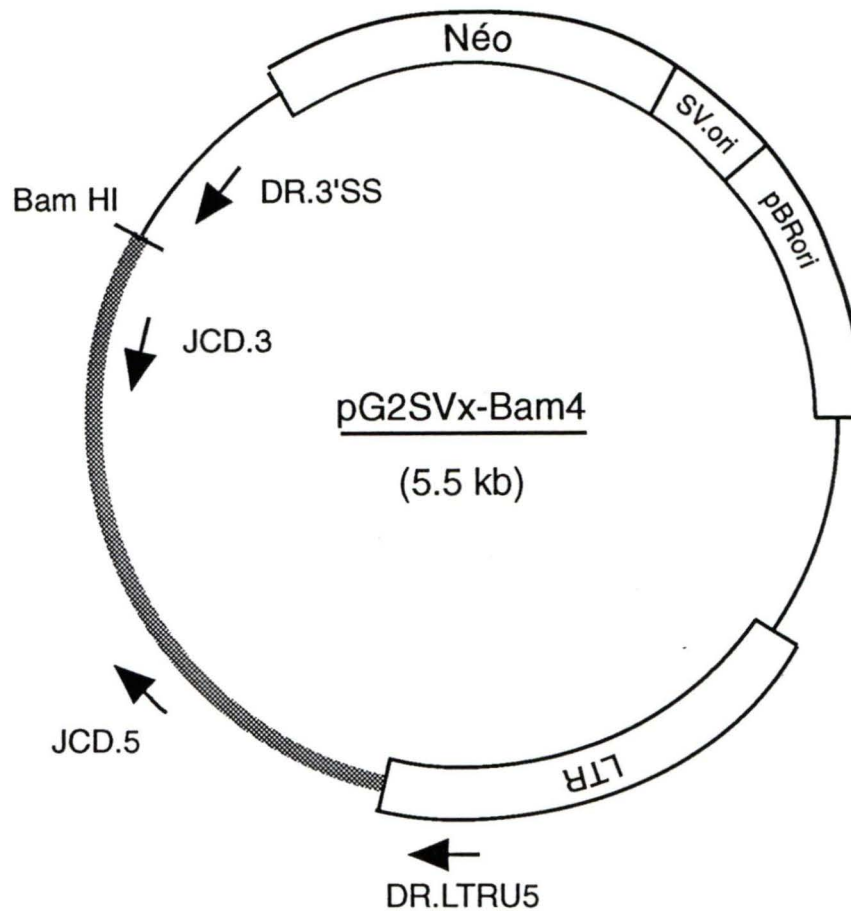


Figure 12: Carte du plasmide pG2SVx-Bam4.

Ce plasmide de 5.5Kb provient de l'ADN cellulaire de T-G2SVx digéré par BamHI. La bande de 5.5Kb hybridant avec la sonde correspondant au gène Néo fut liguée et le plasmide ainsi obtenu est amplifié dans des bactéries *E. coli*. La ligne foncée indique l'ADN cellulaire (région flanquante du rétrovirus). Le trait fin ainsi que les boîtes représentent l'ADN rétroviral. Les flèches correspondent aux différents oligonucléotides utilisés pour les PCR et le séquençage.

oligonucléotide situé dans la partie U5 du LTR (DR.LTRU5) et un autre dans le site d'épissage 3' (DR.3'SS) (Figure 12). L'amplification à partir de ces oligonucléotides nous donne une bande de 1.5Kb tel que prédit (Figure 13). Cette bande de 1.5Kb fut clonée à l'intérieur du plasmide pCR-1000 (plasmide vendu par Invitrogene pour cloner des produits de PCR).

Cette bande de 1.5Kb est constituée d'ADN cellulaire mais contient toujours une partie rétrovirale de 92pb. Pour obtenir une sonde d'ADN exclusivement cellulaire et être certain qu'il n'y aura pas d'interférence lors de son utilisation, il nous faut utiliser des oligonucléotides à l'intérieur du 1.5Kb. Pour ce faire nous avons séquencé la portion 5' et 3' du fragment de 1.5Kb cloné, à l'aide des oligos DR.LTRU5 et DR.3'SS et identifié 2 oligonucléotides internes: JCD.3 et JCD.5 (Figure 12 et 13). L'amplification à partir de ces derniers nous procure un produit de 0.8Kb (Figure 13 et 14). Ce fragment de 0.8Kb est lui aussi cloné à l'intérieur du plasmide pCR-1000 et propagé dans les cellules E. coli., afin de pouvoir en produire une quantité plus importante. Il pourra être utilisé comme sonde cellulaire lors de l'étude subséquente du gène suppresseur des cellules G2. L'efficacité de transformation du plasmide pCR-1000 contenant l'insert est de 0.88×10^8 transformants/ μ g de plasmide.

Il serait intéressant de poursuivre le séquençage de l'ADN cellulaire cloné, et d'en comparer les résultats avec des séquences connues.

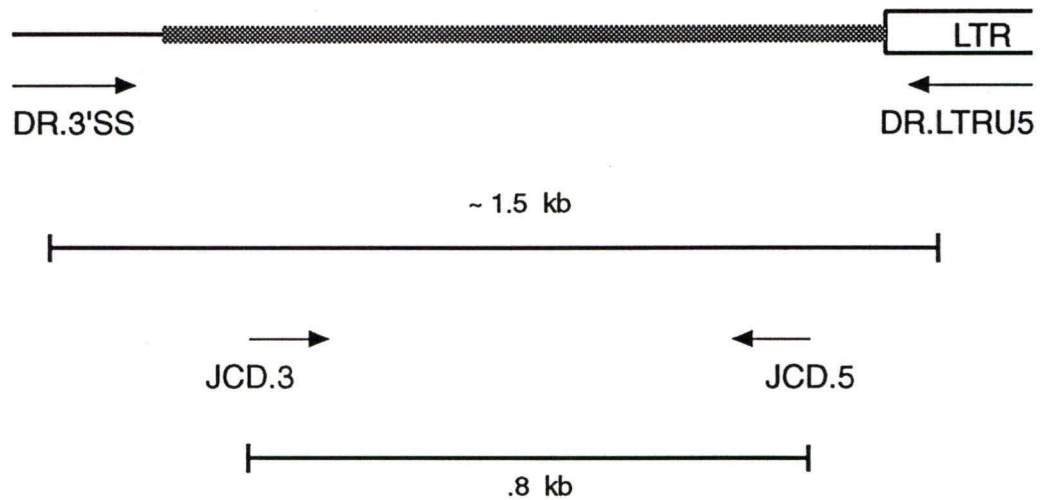


Figure 13: Représentation schématique des produits de PCR sur l'ADN de pG2SVx-Bam4.

Le schéma représente une partie de l'ADN de pG2SVx-Bam4 contenant l'ADN cellulaire de T-G2SVx (trait foncé) et l'ADN rétroviral (trait fin et boîte). Les oligonucléotides utilisés sont représentés par des flèches et la taille des produits de PCR correspondants est indiquée par une ligne continue.

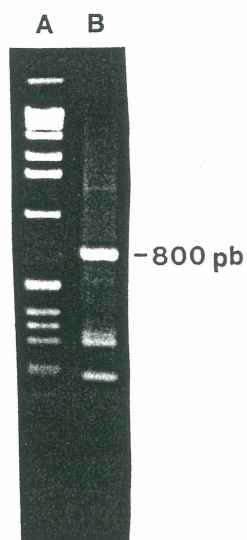


Figure 14: Amplification de la jonction cellulaire de T-G2SVx flanquante au site d'intégration du rétrovirus à partir du plasmide pG2SVx-Bam4.

Amplification, par la technique de PCR, d'une séquence de 800pb à l'aide des oligonucléotides JCD.3 et JCD.5 situés à l'intérieur de la séquence cellulaire dans le plasmide pG2SVx-Bam4. 10% du produit de PCR est séparé sur gel d'agarose 1% plus 2% NuSieve.

DISCUSSION

La lignée cellulaire F4, provenant de cellules de rat transformées par Ad2, possède plusieurs copies intégrées de la région transformante de l'adénovirus (E1). C'est pourquoi elle a été choisie pour l'étude des gènes cellulaires impliqués dans la transformation et dans la suppression, puisque s'il y a réversion du phénotype transformé de ces cellules il y aura peu de chance qu'elle soit due à une mutation dans les séquences du virus oncogène intégré. La lignée détransformée G2 isolée des cellules F4 par sélection à l'aide de la drogue anticancer MGBG, a déjà été identifiée comme étant un bon candidat pour l'étude qui nous intéresse. Malgré son phénotype normal, il y a toujours présence et expression normale des gènes E1 d'Ad2. Des hybrides entre les cellules parentales F4 et les détransformants G2 présentent un phénotype non-transformé ce qui montre que G2 est dominant sur F4 (Weber et al., 1991). L'activation d'un gène cellulaire suppresseur de tumeur dominant spécifique à E1, chez les cellules G2 pourrait expliquer la présence des protéines transformantes sans toutefois que les cellules soient transformées.

Les objectifs de cette étude étaient d'analyser un peu plus en profondeur ce gène cellulaire suppresseur de tumeur en vérifiant s'il était spécifique aux oncogènes adénoviraux ainsi qu'aux cellules de rats (spécifique à l'espèce). De plus, nous avons voulu voir s'il pouvait y avoir réversion du phénotype non-transformé chez les cellules G2 par mutagenèse d'insertion rétrovirale et s'il était possible de cloner ce gène suppresseur potentiel.

Il a déjà été démontré que la protéine E1a s'associait au produit du gène Rb (p105) dans des cellules infectées et transformées par Ad (Whyte et al., 1988). La protéine Rb se lie aux domaines 1 (nucléotide 30 à 59) et 2 (nucléotide 120 à 127) de la protéine E1a (Whyte et al., 1989). Il a aussi été montré que la protéine grand T de SV40 (DeCaprio et al., 1988) forme elle aussi un complexe spécifique avec la protéine Rb de la même manière que E1a. La même chose fut démontrée en ce qui concerne la protéine E7 du papillomavirus humain HPV16 (lien Rb-E7) (Dyson et al., 1989). Ces trois protéines virales semblent donc faire partie de la même famille d'oncogènes capables de lier Rb. Ces 2 derniers oncogènes peuvent être utilisés pour notre étude car ils ont la capacité de transformer des lignées cellulaires primaires sans la coopération d'un second oncogène (Halbert et al., 1991; Tooze, 1980).

Les expériences de transfection à l'aide de plasmides portant les oncogènes SV40-T ou HPV16-E7, sur les cellules G2 montrent qu'elles sont transformées par ces 2 oncogènes tout comme la lignée cellulaire révertante contrôle G4F. Cette dernière est non-transformée due à la perte des copies intégrées de E1a. Ainsi, ces expériences nous permettent de conclure que la résistance des cellules G2 à la retransformation est spécifique aux oncogènes adénoviraux. Ces derniers résultats sont en accord avec des travaux précédents qui montraient que G2 est résistant à la transformation par des plasmides portant E1a d'Ad2, E1a-E1b d'Ad2 ou E1a-E1b d'Ad12 mais non aux plasmides portant les oncogènes hétérologues N-ras, c-myc et moyen T de polyome (Sircar et al., 1988).

Le caractère dominant du phénotype suppresseur de tumeur des cellules G2 est confirmé par la construction d'hybrides entre les cellules G2 et les cellules 293 (cellules humaines transformées par Ad5). En effet, le phénotype transformant des cellules 293 est significativement supprimé par les cellules G2 dans ces hybrides. Donc, le gène suppresseur n'est pas restreint aux cellules de rats mais est aussi fonctionnel dans les hybrides entre des cellules de rats et des cellules humaines.

On peut se demander quelle peut être la nature de ce suppresseur de tumeur spécifique à E1? On constate lors d'expériences d'immunoprécipitation, que Rb et 300K sont coimmunoprécipitées avec la protéine E1a dans les cellules G2 (il y a donc formation de complexe Rb-E1a et 300K-E1a). Ces dernières observations suggèrent que bien que le complexe soit nécessaire pour la transformation, il se peut qu'il ne soit pas suffisant par lui-même pour mener à la transformation complète étant donné que les cellules G2 ne sont pas transformées. Il a déjà été observé que la liaison de p53 et de Rb aux oncogènes n'est pas suffisante pour la transformation complète par un hybride polyomavirus-grand T de SV40 (Manfredi et Prives, 1990). Il semble également exister un patron de transformation contournant la séquestration de Rb, du moins dans le contexte HPV16-E7 (Jewers et al., 1992). Le mécanisme de transformation est un mécanisme à 2 étapes: l'immortalisation et la transformation complète. Il est permis de croire que le blocage de la transformation chez les cellules G2 affecterait la deuxième étape. Ce blocage pourrait s'effectuer en aval de la séquestration de Rb et 300K dans une étape qui n'est pas partagée par les autres virus oncogènes à ADN. Une des actions possibles de notre gène suppresseur de la transformation

présent dans les cellules G2, serait d'inactiver le facteur de transcription E2F qui ne peut l'être par Rb étant complexé avec E1a.

Pour permettre l'étude plus approfondie du gène suppresseur, on a effectué une mutagenèse par insertion rétrovirale avec le rétrovirus ZIPnéoSVx. Cette expérience a été possible due à l'absence de clone G2 spontanément transformé. L'intégration du rétrovirus a apparemment inactivé le gène suppresseur à l'intérieur des cellules G2, tout comme ce fut le cas par insertion à l'aide de N2. En effet, l'insertion rétrovirale ne semble pas avoir activée un proto-oncogène car il n'a pas été possible d'obtenir de transformants lorsque la même stratégie fut utilisée avec les cellules G4F et FR3T3 comme contrôles.

L'intégration du rétrovirus près du locus du gène suppresseur pourrait faciliter son clonage, ce qui s'avère important pour une meilleure compréhension des événements qui provoquent la tumorigénicité chez les cellules transformées. Plusieurs études ont démontré qu'il avait été possible de cibler et d'isoler des proto-oncogènes ayant été activés par insertion rétrovirale, en identifiant les sites d'intégration du rétrovirus (Shih et al., 1988; Van Lohuizen et al., 1989; Ben-David et al., 1990).

Ces études pourront éventuellement fournir les bases d'une nouvelle thérapie du cancer à l'aide de produits imitant les antioncogènes qui auraient une activité suppressive de tumeur.

L'utilisation du vecteur pZIPnéoSV(x) pour l'insertion rétrovirale fut un bon choix pour faciliter le clonage des régions flanquantes du rétrovirus intégré. Effectivement, ce vecteur possède les origines de réplication eucaryote et procaryote. Après son intégration dans l'ADN cellulaire, il peut facilement être récupéré par recircularisation de l'ADN génomique, digéré avec un enzyme de restriction ne coupant pas à l'intérieur de la séquence rétrovirale ou des 2 origines de réplication. Cette stratégie nous a permis de cloner la séquence cellulaire flanquante du site d'intégration rétrovirale.

Pour vérifier si la portion d'ADN cellulaire qui a été clonée fait partie d'un exon ou d'un intron il faudrait vérifier sa transcription. Ainsi, si la partie clonée est transcrite en ARN il sera possible de le détecter par analyse de Northern en utilisant la région cellulaire clonée comme sonde. S'il y a transcription de cette région, nous pourrions le détecter. Si c'est le cas, il sera possible d'utiliser cette sonde pour cribler une librairie de c-DNA préparée à partir des cellules G2 et tester la suppression de l'oncogène E1. S'il n'y a pas expression ou s'il ne s'agit pas du gène supresseur, nous devons utiliser la technique de marche chromosomique pour arriver à l'intérieur de l'exon le plus près afin de localiser le supresseur.

Lorsque le supresseur de tumeur sera isolé, il restera à le caractériser ce qui implique le séquençage (à terminer), la recherche d'homologie et l'analyse de l'activité suppressive contre les autres membres de la famille d'oncogènes liés à p105-Rb. L'analyse directe de cette dernière question par la transfection des cellules G2 par SV40-T et HPV16-E7 a déjà été démontrée dans la première partie de mon étude.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Joseph Weber pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour son aide du point de vue scientifique et ses encouragements.

Je remercie également tout le personnel et les étudiants du laboratoire du Dr. Weber ainsi que du département de microbiologie, et plus particulièrement le Dr. Joseph Horvath et Mounir Diouri, pour leur amitié, leurs connaissances et leur aide afin de mieux parfaire mon apprentissage. Je voudrais aussi remercier Lise Imbeault et Sylvie Deslandes pour avoir bien voulu lire et corriger ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers la Société de Recherche sur le Cancer pour son soutien financier ainsi que les Dr. Louise Bouchard et Darel Hunting pour avoir accepté de prendre le temps de lire et de commenter ce mémoire.

RÉFÉRENCES

- Armentano, D., Yu, S.F., Kantoff, P.W., Von Ruden, T., Anderson, W.F. et Gilbaa, E. (1987). Effect of internal viral sequences on the utility of retroviral vectors. *J. Virol.* 61: 1647-1650.
- Asselin, C. et Bastin, M. (1985). Sequences from polyomavirus and simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. *Virology* 56: 958-968.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. et Nevins, J. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62: 659-669.
- Baker, C.C. et Ziff, E.B. (1981). Promoters and heterogenous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2. *J. Mol. Biol.* 149: 189.
- Bauer, M., Guhl, E., Graessmann, M. et Graessmann, A. (1987). Cellular mutation mediates T-antigen-positive revertant cells resistant to simian virus 40 transformation but not to retransformation by Polyomavirus and Adenovirus type 2. *J. Virol.* 61: 1821-1827.
- Ben-David, Y., Giddens, E.B. et Bernstein, A. (1990). Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1332-1336.
- Berk, A.J. et Sharp, P.A. (1978). Structure of adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* 17: 935-944.
- Berk, A.J., Lee, F., Harrison, J., Williams, J. et Sharp, P.A. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*, 17: 935-944.
- Berk, A.J. (1986). Adenovirus promoters and E1a transactivation. *Ann. Rev. Genet.* 20: 45-79.
- Blochlinger, K. et Diggelmann, H. (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with high eucaryotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2929-2931.
- Borelli, E., Hen, R. et Chambon, P. (1984). Adenovirus 2 E1a products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature*, 312: 608.

- Boulanger, P.A. et Blair, G.E. (1991). Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem. J.* 275: 281-299.
- Branton, P.E., Baley, S.T. et Graham, F.L. (1985). Transformation by Human adenoviruses. *Biochem. Biophys. Acta.* 780: 67-94.
- Cepko, C.L., Roberts, B.E. et Mulligan, R.C. (1984). Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37: 1053-1062.
- Chellappan, S., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. et Nevins, J. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061.
- Chellappan, S., Kraus, K.B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P.M., Phelps, W.C. et Nevins, J.R. (1992). Adenovirus E1A, Simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4549-4553.
- Chow, L.T., Roberts, J.M., Lewis, J.B. et Broker, T.R. (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* 11: 819.
- Chow, L.T., Broker, T.R. et Lewis, J.B. (1979). Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.* 134: 265-303.
- Cone, R., Grodzicker T. et Jaramillo, M. (1988). A retrovirus expressing the 12S Adenoviral E1A gene product can immortalize epithelial cells from a broad range of rat tissues. *Molec. Cell. Biol.* 8: 1036.
- Courtneidge, S.A. et Smith, A.E. (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* 303: 435.
- Craig, R.W. et Sager, R. (1985). Suppression of tumorigenicity in hybrids of normal and oncogene-transformed CHEF cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2062-2066.
- Davis, R.W., Bolstein, D. et Roth J.B. (1980). A manual for genetic engineering: advance bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., N.Y., p. 184.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J., Huang, C., Lee, W., Marsilio, E., Paucha, E. et Livingston, D.M. (1988). SV40 large T antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastomae susceptibility gene. *Cell* 54: 275-283.
- Dion, P.A., Fleurent, J., Roberge, D. et Weber, J.M. (1992). Reduction of c-myc

expression correlated with E1a expression but not with the transformed phenotype. *Virus Res.* 26: 231-240.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. et Harlow, E. (1989). The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.

Fattaey, A.R., Helin, K., Dembski, M.S., Dyson, N., Harlow, E., Vuocolo, G.A., Hanobik, M.G. (1993). Characterization of the retinoblastoma binding proteins RBP1 and RBP2. *Oncogene* 8: 3149-3156.

Fields, N.B. (1985). Chapitre 12, Green, M. Transformation and oncogenesis: DNA Viruses, p. 183, 187, 211. Chapitre 23, Horwitz, M.S. Adenoviruses and their replication, p. 433, dans *Virology*, Raven Press, N.Y.

Flint, S.J. (1981). Transformation by adenovirus. In: J. Tooze (ed.), *DNA Tumor viruses*, pp. 547-576. Cold spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Frankel, W., Potter, T.A., Rosenberg, N., Lenz, J., Rajan, T.V. (1985). Retroviral insertional mutagenesis of a target allele in a heterozygous murine cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6600-6604.

Gallimore, P.H., McDougall, J.K. et Chen, L.B. (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. *Cell* 10: 669-678.

Gallimore, P.H., Sharp, P.A. et Sambrook, J. (1974). Viral DNA in transformed cells. *J. Mol. Biol.* 89: 49-72.

Graham, F.L. (1987). Growth of 293 cells in suspension culture. *J. Gen. Virol.* 68: 937-940.

Graham, F.L., Van der Eb, A.J. et Heijneker, H.L. (1974). Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature (Lond.)*, 251: 687-691.

Green, M.R. (1989). When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 56: 1-3.

Halbert, C.L., Demers, G.W. et Galloway, D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65: 473-478.

Hauweling, A., Van Der Elsen, P.J. et Van Der Eb A.J. (1980). Partial transformation of

- primary rat cells by the left most 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* 105: 537.
- Heaton, M.A. et Flintoff, W.F. (1988). Methylglyoxal-bis(guanylhyazone)-resistant Chinese Hamster Ovary cells: Genetic evidence that more than a single locus controls uptake. *J. Cell. Physiol.* 136: 133-139.
- Hen, R., Borelli, E. et Chambon, P. (1985). Repression of the immunoglobulin heavy chain enhancer by the adenovirus-2 E1a products. *Sciences*, 230: 1391.
- Hoffman, W.J., Steffen, D., Gusella, J., Tabin, C., Bird, S., Cowing, D. et Weinberg, R.A. (1982). DNA methylation affecting the expression of murine leukemia proviruses. *J. Virol.* 44: 144-157.
- Hong, F.D., Huang H-J.S., To, H., Young, L-J.S., Oro, A., Bookstein, R. et al. (1989). Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5502-5506.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P. et Lane, W.T. (1962). Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus type 12 and 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2051-2058.
- Huebner, R.J., Casey, M.J., Chanock, R.M. et Schell, K. (1965). Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3 : sharing of tumor antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus type 7 tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 54: 381-388.
- Jewers, R.J., Hildebrandt, P., Ludlow, J.W., Kell, B. et McCance, D.J. (1992). Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J. Virol.* 66: 1329-1335.
- Jones, N. et Shenk, T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3665-3669.
- Kimelman, D., Miller, J.S., Porter, D. et Roberts, B.E. (1985). *J. Virol.* 53: 399-409.
- King, W., Patel, M.D., Lobel, L.I., Goff, S.P., Nguyen-Huu, M.C. (1985). Insertion mutagenesis of embryonal carcinoma cells by retroviruses. *Science* 228: 554-558.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. et Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, 56: 77-84.
- Kitchingman, G.R., Lai, S.-P. et Westphal, H. (1977). Loop structures in hybrids of early RNA and separated strands of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 4392.

- Kitchingman, G.R. et Westphal, H. (1980). The structure of adenovirus 2 early nuclear and cytoplasmic RNAs. *J. Mol. Biol.* 13: 23.
- Lane, D.P. et Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261.
- Lee, W-H., Shew, J-Y., Hong, F., Sery, T., Donoso, L.A., Young, L.J., et al. (1987). The rerinoblastoma susceptibility gene product is a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329: 642-645.
- Lewis, J.B. et Mathews, M.B. (1981). Viral messenger RNAs in six lines of adenovirus-transformed cells. *Virology* 115: 345-360.
- Manfredi, J.J. et Prides, C. (1990). Binding of p53 and p105-RB is not sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 64: 5250-5259.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 1st edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, New York.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, New York.
- Marshall, T., Pater, A. et Pater. M.M. (1989). Trans-regulation and differential cell specificity of human papillomavirus types 16, 18 et 11 cis-acting elements. *J. Med. Virol.* 29: 115-126.
- McCormick, F. et Harlow, E. (1980). Association of a murine 53, 000 Dalton phosphoprotein with Simian virus 40 large-T antigen in transformed cells. *J. Virol.* 34: 213.
- Montell, C., Courtois, G., Eng, C. et Berk, A. (1984). Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1a proteins. *Cell* 36: 951-961.
- Nevins, J.R. (1981). Mechanism of activation of early viral transactivation by the adenovirus E1a gene product. *Cell*, 26: 213-220.
- Noda, M., Selinger, Z., Scolnick, E.M. et Bassin, R.H. (1983). Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5602-5606.
- Pereira, M.S., Pereira, H.G. et Clarke, S.K. (1965). Human Adenovirus type 31, a new

- serotype with oncogenic properties. *Lancet*, 1, 21-23.
- Perricaudet, M.G., Akusjarvi, G., Virtanen, A. et Petterson, U. (1979). Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* 281: 694-696.
- Peters, G. (1990). Oncogenes at viral integrations sites. *Cell Growth and different*, 1: 503-510.
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. et Howley, P.M. (1988). *Cell* 53: 539-547.
- Rabson, A.S., Kirschstein, R.L. et Paul, F.J. (1964). Tumors produced by adenovirus 12 in Mastomys and Mice. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 32 (1): 77-87.
- Raychaudhuri, P., Bagchi, S., Deveto, S.H., Kraus, V.B., Moran, E. et Nevins, J.R. (1991). Domains of the adenovirus E1A protein required for oncogenic activity are also required for dissociation of E2F transcription factor complexes. *Genes Dev.* 5: 1200-1211.
- Ricciardi, R.-P., Jones, R.L., Cepko, C.L., Sharp, P.A. et Roberts, B.E. (1981). Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6121.
- Rodrigues, M., Dion, P. et Weber, J. M. (1989). Tumor necrosis factor mediated cytotoxicity requires the adenovirus E1A protein but not the transformed phenotype. *Virus Research*, 15: 231-236.
- Rodrigues, M.T., Palkonyay, L., Sircar, S., Fleurent, J., Dessureault, J. et Weber, J.M. (1987). Isolation and uptake characteristics of adenovirus transformed cell revertants resistant to the antiproliferative effects of methylglyoxal bis(guanyldrazone). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 147: 675-681.
- Ruley, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*, 304: 602-609.
- Rupniak, H.T. et Paul, D. (1980). Selective killing of transformed cells by exploitation of their defective cell cycle control by polyamines. *Cancer. Res.*, 40: 293-297.
- Rupniak, H.T. et Paul, D. (1978). Inhibition of spermidine and spermine synthesis to growth arrest of rat embryofibroblast in G1. *J. Cell. Physiol.*, 94: 161-170.
- Ryan, K.W., Christensen, J.B., Imperiale, M.J. et Brockman, W.W. (1985). Isolation of a simian virus 40 T-Antigen-positive, transformation-resistant cell line by indirect

- selection. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 3577-3582.
- Sambrook, J., Bolcham, M., Gallimore, P., Ozanne, B., Petterson, U., Williams, J. et Sharp, P.A. (1975). Viral DNA sequences in transformed cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39: 615.
- Sambrook, J., Greene, R., Stringer, J., Mitchison, T., Hu, S.L. et Botchan, M. (1979). Analysis of the sites of integration of viral DNA sequence in rat cells transformed by Ad2 and SV40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44: 569.
- Samid, D., Flessate, D.M. et Friedman, R.M. (1987). Interferon-induced revertants of ras-transformed cells: cells resistance to transformation by specific oncogenes and retransformation by 5-azacytidine. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2196-2200.
- Sarnow, P., Ho, Y.-S., Williams, J. et Levine, A.J. (1982). Adenovirus E1b 58Kd tumor antigen and SV40 Large T antigen are physically associated with the same 54Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387-394.
- Sharp, P.A., Gallimore, P.H. et Flint, S.J. (1974). Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 457.
- Sharp, P.A. (1984). In the adenoviruses (Ginsberg, H.S., ed.), pp. 173-204, Plenum Press, New York.
- Shenk, T. et Flint, J. (1991). Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv. Cancer. Res.* 57: 47-85.
- Shih, C.C., Stoye, J.P. et Coffin, J.M. (1988). Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell*, 53: 531-537.
- Simon, M.C., Kitchener, K., Kao, H.-T., Hickley, E., Weber, L., Voellmy, R., Heintz, N. et Nevins, J.R. (1987). Selective induction of human heat shock genes transcription by the adenovirus E1a products, including the 12S E1a product. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2884.
- Sircar, S., Palkonyay, L., Rodrigues, M., Allaire, S., Horvath, J., Thirion, J.-P. et Weber, J. (1987). Isolation of variants resistant to methyglyoxal Bis (guanylhidrazone) from Adenovirus-transformed rat cell. *Cancer Research* 47: 1339-1343.
- Sircar, S., et Weber, J.M. (1988). Normalization of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor production in drug resistance variants derived from

- adenovirus transformed cells. *J. Cell. Physiol.* 134: 467-472.
- Sircar, S., Rodrigues, M. et Weber, J.M. (1988). Resistance to retransformation by Ad but not by heterologous oncogenes in an E1-positive transformation revertant cell line may be mediated by a cellular function. *Oncogene* 3: 725-728.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biology*, 98: 503-517.
- Southern, P.J. et Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cell to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327-341.
- Stein, E. et Ziff, E.B. (1984). HeLa cell B-tubuline gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an Ela dependant mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2792-2801.
- Strauss, S.E. (1984). In the adenoviruses (Ginsberg, H.S., ed.) pp.451-496, Plenum Press, New York.
- Tooze, J. (1980). DNA Tumor Viruses: Molecular Biology of tumor viruses, Part 2. Chapitre 10, pp.547-576. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. et Taylor, G. (1962). The quest for human cancer viruses, a new approach to an old problem reveals cancer induction in hamsters by human adenovirus. *Science*, 137: 835-841.
- Van Den Elsen, P.J., Houweling, A. et Van der Eb, A.J. (1983). Expression of region E1b of human adenoviruses in the absence of region E1a is not efficient for complete transformation. *Virology*, 128: 377-390.
- Van Den Eb, E.J., Mulder, C., Graham, F.L. et Houweling, A. (1977). Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene*, 2: 115-132.
- Van Lohuizen, M., Breuer, M. et Berns, A. (1989). N-myc is frequently activated by proviral insertion in MuLV-induced T cell lymphomas. *EMBO. J.*, 8: 133-136.
- Velcich, A., Kern, F.G., Basilico, C. et Ziff, E.B. (1986). Adenovirus E1a proteins repress expression from polyomavirus early and late promoters. *Molecular and cellular biology* 6: 4019-4025.
- Wahl, G.M., Stern, M. et Stark, G.R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments

- from agarose gels to diazobenzyloxy-methyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3683-3687.
- Weber, J.M., Sircar, S., Fleurent, J. et Hamel, M. (1990). Drug-induced revertants of adenovirus-transformed cells: retransformation by 5-azacytidine without reactivation of E1a. *J. of general. Virology*, 71: 585-591.
- Weber, J.M., Sircar, S., Horvath, J. et Dion, P. (1989). *Cancer Res.* 49: 5779-5783.
- Weber, J.M., Sircar, S., Rodrigues, M., Cai, F. et Horvath, J. (1991). Dominant suppression of adenovirus mediated transformation and insufficiency of p105 Rb binding as a condition for oncogenic transformation. *Oncogene* 6: 989-993.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146.
- Weintraub, S.J., Prater, C.A., Dean, D.C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358: 259-261.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. et Harlow, Ed. (1988). Association between an oncoprotein and an antioncogene: the adenovirus E1A protein bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334: 124-129.
- Whyte, P., Williamson, N.M. et Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56: 67-75.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. et Chassin, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1373-1376.
- Zarbl, H., Latreille, J. et Jolicoeur, P. (1987). Revertants of v-fos-Transformed fibroblasts have mutations in cellular genes essential for transformation by other oncogenes. *Cell* 51: 357-369.

ANNEXE

Adenovirus Transformation Revertant Resistant to Retransformation by E1 But Not by SV40-T and HPV16-E7 Oncogenes

SUCHETA SIRCAR, JOSEPH HORVATH,¹ DOMINIQUE ROBERGE, MOUNIR DIOURI, AND JOSEPH M. WEBER²

Département de microbiologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4 Canada

Received April 13, 1992; accepted July 21, 1992

We have previously described a revertant cell line which expresses a dominant tumor suppressor phenotype to E1 but not to heterologous oncogenes such as c-myc, N-ras, or polyoma middle t (Sircar *et al.* (1988) *Oncogene* 3, 725-728). DNA tumor virus oncogenes have been suggested to transform cells via the common mechanism of sequestering the Rb-105 antioncoprotein. This paradigm would predict that our revertant cell line, which is resistant to retransformation by E1a, should also be resistant to the other members of the Rb-105 binding family of oncogenes. To test this hypothesis we transfected the revertant cell line with plasmids bearing SV40-T or the HPV16-E7 oncogenes. Because transformation was obtained by both oncogenes at efficiencies similar to the transformation of a related revertant cell line, the results suggest that the resistance phenotype is specific to E1a. This specificity was further confirmed by cell fusion experiments. © 1992 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

We have previously reported on an adenovirus transformation revertant cell line, named G2, which has a number of remarkable properties. The G2 cells were isolated from an ad2-transformed rat cell line (F4) which contains 16 tandemly integrated copies of the E1 genes (Sircar *et al.*, 1987). The revertant G2 cell line continues to express E1a and E1b proteins, is resistant to retransformation by E1 genes (but not to N-ras, c-myc, or polyoma middle t), and cell hybrids between G2 and F4 cells are nontransformed (Weber *et al.*, 1991). This dominant adenovirus-specific, tumor-suppressor phenotype was apparently inactivated by retrovirus insertion mutagenesis. Adenoviruses, papovaviruses, and papilloma viruses have been suggested to transform cells via the common mechanism of sequestering the retinoblastoma (Rb) gene product (Whyte *et al.*, 1988; DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989). In its simplest form this paradigm would suggest that the revertant G2 cell line should also be resistant to retransformation by the other members of the Rb-binding family of oncogenes. The objective of the experiments reported here was to test this prediction.

MATERIALS AND METHODS

Cells

G2 and G4F cells are revertants derived from the Ad2-transformed F4 rat cells. G2 expresses E1 genes

but is resistant to retransformation by them, while G4F had lost the E1a gene and is readily transformable (Sircar *et al.*, 1988). Both cell lines are nontumorigenic. The 293 cells are transformed by Ad5 and have been extensively used and described before (Graham, 1987). These cells grow well in agar but are only weakly tumorigenic. Standard culture conditions were employed using DMEM and 10% fetal bovine serum.

Plasmids and transfection

The SV40 large T antigen was contained in plasmids Δ2005 which also expresses the neo marker. Because of a deletion in the large T intron between 0.54 and 0.59 map units this mutant does not produce the small t antigen (Asselin and Bastin, 1985). The human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 gene was contained in plasmid pD7 (Marshall *et al.*, 1989), kindly provided by Mary Pater (Memorial University of Newfoundland, St. John's). This plasmid transforms established cell lines better than does viral DNA, although E7 expression can only be detected at the level of RNA (M. Pater, personal communication). Cotransfection experiments were carried out with the G418-resistance bearing pSV2neo plasmid (Southern and Berg, 1982).

Transfections were performed by using a modification of the calcium phosphate coprecipitation method (Wigler *et al.*, 1979). Ten micrograms of plasmid DNA, and in the case of pD7, additionally 2 μg of pSV2neo was used for transfection. After a 2-day expression period the cells were passaged and selected in 400 μg/ml (effective concentration) G418. Well-separated colonies were picked and cell lines established for further testing.

¹ Present address: St. Joseph's Cancer Institute, P.O. Box 4227, Tampa, FL 33677-4227.

² To whom reprint requests should be addressed.

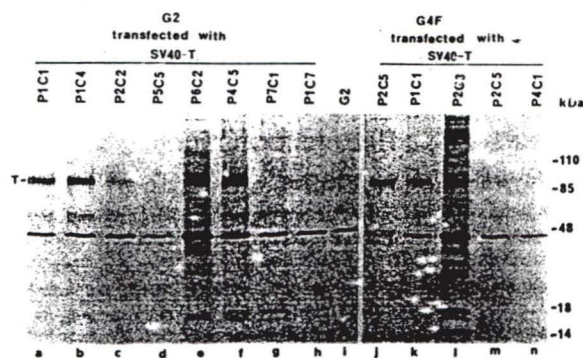


Fig. 1. Immunoprecipitation of SV40 large T antigen from revertant cells transfected with SV40-T. Cells were metabolically labeled with [35 S]methionine and lysates precipitated with anti-T serum. Protein complexes were separated by electrophoresis on a 12% SDS-polyacrylamide gel and detected by autoradiography. G2 (E1a⁺) and G4F (E1a⁻) are revertants derived from the Ad2-transformed F4 cell line. The 90-kDa SV40-T antigen band is indicated by T at the left.

Transformed cell properties

Colony formation efficiency in soft agar and tumorigenicity in nude mice were described before (Weber *et al.*, 1990). Nude mice were injected at three sites with 3×10^5 cells and observed for 120 days.

Cell hybrids

G2 cells were transfected with the hygromycin B-bearing plasmid (Blochliger and Diggelman, 1984), while the 293 cells were transfected with the pSV2neo plasmid to G418 resistance. These cells were fused with polyethylene glycol (PEG-1000, Sigma) and hybrids selected with both drugs as described previously (Weber *et al.*, 1991). Hybrid status was confirmed by chromosome counts.

Immunoprecipitation

Cells labeled for 2 hr with [35 S]methionine (200 μ Ci/ml: 1000 Ci/mmol) were lysed with ELB buffer (50 mM HEPES, pH 7.0, 250 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) and the supernatant of a 5 min, 12,000 *g* microfuging was precipitated with 10 μ l antiserum on ice for 1 hr, followed by 20 μ l of a 50% protein A suspension for 1 h at 4°C. The protein A-Sepharose beads were washed three times in ELB and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Anti-E1a monoclonal antibody (M73) was purchased from Oncogene Science, Inc. (Manhasset, NY). Anti-SV40-T serum was kindly supplied by Cathy Rundell (Northwestern University, Chicago).

RNA dot-blots

RNA was purified from the cytoplasmic fraction in the presence of 1 mM vanadyl ribonucleoside complex (BRL), 3.5 M urea, 1% SDS (in 0.24 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.01 M EDTA) followed by phenol-chloroform extraction. Precipitated cytoplasmic RNA was resuspended in 50% formamide, 5% formaldehyde MOPS (Sigma). Dilutions were made in 20 \times SSC and RNA (corresponding to approximately 3×10^6 cells/spot) was deposited in duplicate using a 96-well manifold filtration apparatus (BRL) on nitrocellulose filters presoaked in 20 \times SSC and fixed at 80°C for 2 hr. Prehybridization was for 24 hr at 42°C in 50% formamide-5 \times Denhardt-5 \times SSC-100 μ g/ml calf thymus DNA and 100 μ g/ml yeast RNA, followed by hybridization at the same conditions with the probes. Duplicate filters were hybridized either with the pD7 (for HPV16-E7) or with the GAPDH plasmid (a housekeeping gene to quantify the RNA in the dot-blots). The E7 probe was a 132 nt *Pst*I fragment isolated from pD7. GAPDH was a 1.4-kb *Pst*I fragment from pGEM3 carrying a rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA (kindly supplied by E. Ziff, New York University Medical Center). The probes were labeled with [32 P]-dCTP using the multiprime DNA labeling system kit (Amersham).

RESULTS

Is transformation resistance specific to E1?

We have previously shown that G2 cells were resistant to retransformation by adenovirus E1 but not by polyoma middle t, c-myc, and N-ras oncogenes (Sircar *et al.*, 1988). Because DNA tumor virus oncogenes appear to transform cells by a common mechanism, we asked if G2 cells would also be resistant to transformation by other members of the Rb-binding family of oncogenes.

G2 cells (and G4F cells as control) were transfected with plasmids bearing the G418-resistance gene and

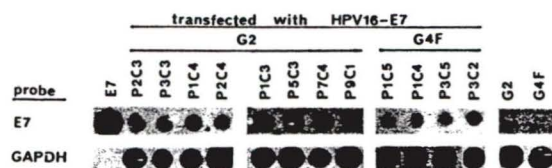


Fig. 2. RNA dot-blots to measure the expression of the E7 oncogene. Cytoplasmic RNA samples were deposited on duplicate filters and hybridized with the E7 probe or the housekeeping gene probe GAPDH (control), as described under Materials and Methods.

TABLE 1
TRANSFORMATION OF REVERTANT AND CONTROL CELL LINES WITH SV40-T AND HPV16-E7 ONCOGENES

Oncogenes transfected ^a	Recipient cell lines	Cell lines ^b	Colony formation in soft agar (%)	SV40-T or E7 expression ^c	Tumorigenicity in nude mice	
					Tumors/site	Tumor-free days ^d
—	—	F4	59.5	—	24/27	20
—	—	G2	3.0	—	0/69	120
—	—	G4F	1.3	—	0/39	60
SV40-T	G2	P1C1	37.5	++	2/9	45
SV40-T	G2	P4C5	33.5	++	2/9	56
SV40-T	G2	P1C4	28.0	++	1/9	60
SV40-T	G2	P2C2	18.0	+	0/9	80
SV40-T	G2	P6C2	18.0	+	0/9	90
SV40-T	G2	P7C1	15.5	—	ND	ND
SV40-T	G2	P5C5	13.4	—	0/9	90
SV40-T	G2	P1C7	11.2	—	0/9	90
SV40-T	G4F	P2C5	27.0	++	1/9	48
SV40-T	G4F	P1C1	26.5	+	1/9	38
SV40-T	G4F	P2C3	26.6	+	1/9	51
SV40-T	G4F	P4C5	14.0	±	0/9	100
SV40-T	G4F	P4C1	7.0	—	ND	ND
HPV16-E7	G2	P1C3	19.0	++	1/9	49
HPV16-E7	G2	P5C3	18.5	++	1/9	49
HPV16-E7	G2	P9C1	18.0	++	1/9	37
HPV16-E7	G2	P1C4	15.5	+	0/9	65
HPV16-E7	G2	P2C3	14.5	+	0/9	90
HPV16-E7	G2	P3C3	12.7	+	0/9	51
HPV16-E7	G2	P2C4	7.0	+	0/9	49
HPV16-E7	G2	P7C4	6.0	++	0/9	60
HPV16-E7	G4F	P2C3	18.5	ND	1/9	49
HPV16-E7	G4F	P2C5	18.0	ND	1/9	49
HPV16-E7	G4F	P2C7	16.7	ND	0/9	51
HPV16-E7	G4F	P3C5	16.5	+	0/9	67
HPV16-E7	G4F	P3C2	13.5	+	0/9	120
HPV16-E7	G4F	P1C5	13.2	+	0/9	49
HPV16-E7	G4F	P1C4	11.2	+	0/9	110
HPV16-E7	G4F	P4C1	6.5	ND	0/9	49

^a For SV40-T, plasmid Δ2005 was used which also carries the neo gene.

^b P designates petri dish, C, clone, which were picked from G418-resistant transfectants.

^c Relative amount estimated from immunoprecipitations (SV40-T) or RNA dot-blots (E7).

^d Designates the day a tumor was first observed or, in the absence of tumors the length of observation prior to death of mouse.

the HPV16-E7 oncogene or the SV40-T oncogene (which carries a neo marker) and well-separated G418-resistant colonies were picked and expanded into cell lines. For control, similar transfection experiments were carried out on a related revertant cell line, named G4F, which was derived from the same parental cell line as G2 but differs in that this line had lost the integrated E1 genes (Weber *et al.*, 1990; Dion *et al.*, 1992). The expression of the transfected oncogenes was tested by immunoprecipitation in the case of SV40-T (Fig. 1) and by RNA dot-blots in the case of E7 (Fig. 2). The latter was necessitated by difficulties in obtaining

adequate immunoprecipitation results with E7 antisera. While the levels of E7-specific RNA appeared to vary only two- to threefold, the levels of precipitable SV40-T antigen showed a greater degree of variability in the different cell lines. Nevertheless, even the apparently T-negative cell lines might contain low levels of antigen as could be demonstrated upon overexposure of the gel. Overall there was a rough correlation between oncogene expression and transformation, as shown in Table 1. Cell lines which expressed higher levels of T-antigen or E7 RNA grew better in soft agar and were able to induce tumors in nude mice. The

DISCUSSION

By using an adenovirus transformation revertant cell line, which is resistant to retransformation by E1 oncogenes and appears to express a dominant cellular tumor suppressor gene, we determined if it was also resistant to other members of the Rb-binding family of oncogenes. Transfection experiments with plasmids bearing the SV40-T and HPV16-E7 oncogenes showed that this cell line was as transformable as a related revertant cell line (G4F). Both of these oncogenes are capable of transforming established cell lines, or even of primary cells, as reported for E7, without the requirement of a cooperating second oncogene (Halbert *et al.*, 1991; Tooze, 1980). The transformation resistance phenotype of G2 cells appears therefore to be specific to adenovirus oncogenes. This agrees with previous results which showed that G2 was resistant to transformation with plasmids bearing Ad2 E1a, Ad2 E1a-E1b, or Ad12 E1a-E1b, but not to plasmids bearing heterologous oncogenes, such as N-ras, c-myc, or polyoma middle t (Sircar *et al.*, 1988).

The E1-specific transformation resistance phenotype of G2 cells was also demonstrated by means of cell fusion experiments. Hybrids between the parental, E1-transformed F4' cells, and the revertant G2 cells were never transformed (Weber *et al.*, 1991). By constructing hybrids between G2 and the Ad5-transformed human 293 cells we have here confirmed the dominant nature of the tumor suppressor phenotype and further shown that it is operative in interspecies cell hybrids. These properties recall the well-established observation that hybrids between normal and tumor cells generally exhibit a normal phenotype, but subsequently may progress to a tumorigenic phenotype as a result of the loss of chromosomes bearing tumor suppressor genes (Harris, 1988; Marshall, 1991). Combined with genetic observations *in vivo*, this eventually led to Knudson's hypothesis (Knudson, 1971; Weinberg, 1989). The unusual element here arises from the fact that while DNA tumor virus oncogenes behave as dominant oncogenes, the G2 cells abrogate the normally dominant E1 oncogenes. In this respect this cell line is similar to two independently isolated SV40 transformation revertants, A27 and Rev-2 (Ryan *et al.*, 1985; Bauer *et al.*, 1987).

What might be the nature of this E1-specific tumor suppressor phenotype? Rb and 300K were coimmunoprecipitated as E1a complexes in G2 cells (Weber *et al.*, 1991). This suggests that while such complexes might be necessary, they are not sufficient of themselves to bring about full transformation. The binding of p53 and Rb was also not found sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-SV40 large T antigen (Manfredi and Prives, 1990). In addition, it ap-

pears that alternative pathways of transformation which bypass Rb sequestration might also exist at least in the HPV16-E7 context (Jewers *et al.*, 1992). Transformation is generally thought to be a two-step process. It is conceivable that the block expressed in G2 cells affects the second step beyond immortalization. The block therefore might lie in downstream events beyond the sequestration of Rb and 300K proteins, in a step which is evidently not shared by other DNA tumor virus oncogenes. Inactivation of the locus by retrovirus insertion mutagenesis appears to be offering a means to clone and identify the gene in question, and experiments in this direction are currently underway.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society. D.R. was the recipient of a scholarship from the Cancer Research Society, Inc. We thank Lise Imbeault for technical assistance.

REFERENCES

- ASSELIN, C., and BASTIN, M. (1985). Sequences from polyomavirus and simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. *Virology* 56, 958-968.
- BAUER, M., GUHL, E., GRAESSMANN, M., and GRAESSMANN, A. (1987). Cellular mutation mediates T-antigen-positive revertant cells resistant to simian virus 40 transformation but not to retransformation by polyomavirus and adenovirus type 2. *Virology* 61, 1821-1827.
- BLOCHINGER, K., and DIGGELMANN, H. (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with high eucaryotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2929-2931.
- DECAPRIO, J. A., LUDLOW, J. W., FIGGE, J., SHEW, J., HUANG, C., LEE, W., MARSILO, E., PAUCHA, E., and LIVINGSTON, D. M. (1988). SV40 large T antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.
- DION, P. A., FLEURENT, J., and WEBER, J. M. (1992). Reduction of c-myc expression correlated with E1a expression but not with the transformed phenotype. Submitted for publication.
- DYSON, N., HOWLEY, P. M., MUNGER, K., and HARLOW, E. (1989). The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.
- GRAHAM, F. L. (1987). Growth of 293 cells in suspension culture. *J. Gen. Virol.* 68, 937-940.
- HALBERT, C. L., DEMERS, G. W., and GALLOWAY, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Virology* 65, 473-478.
- HARRIS, H. (1988). The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res.* 48, 3302-3306.
- JEWERS, R. J., HILDEBRANDT, P., LUDLOW, J. W., KELL, B., and McCANCE, D. J. (1992). Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *Virology* 66, 1329-1335.
- KNUDSON, A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820-823.
- MANFREDI, J. J., and PRIVES, C. (1990). Binding of p53 and p105-Rb is not sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen. *Virology* 64, 5250-5259.
- MARSHALL, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64, 313-326.

- MARSHALL, T., PATER, A., and PATER, M. M. (1989). Trans-regulation and differential cell specificity of human papillomavirus types 16, 18, and 11 cis-acting elements. *J. Med. Virol.* 29, 115-126.
- RYAN, K. W., CHRISTENSEN, J. B., IMPERIALE, M. J., and BROCKMAN, W. W. (1985). Isolation of a simian virus 40 T-Antigen-positive, transformation-resistant cell line by indirect selection. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3577-3582.
- SIRCAR, S., and WEBER, J. M. (1988). Normalization of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor production in drug resistant variants derived from adenovirus transformed cells. *J. Cell. Physiol.* 134, 467-472.
- SIRCAR, S., PALKONYAY, L., RODRIGUES, M., ALLAIRE, S., HORVATH, J., THIRION, J.-P., and WEBER, J. M. (1987). Isolation of variants resistant to methylglyoxal bis(guanyldrazones) from adenovirus-transformed rat cells. *Cancer Res.* 47, 1339-1343.
- SIRCAR, S., RODRIGUES, M., and WEBER, J. M. (1988). Resistance to retransformation by adenovirus but not by heterologous oncogenes in an E1-positive transformation revertant cell line may be mediated by a cellular function. *Oncogene* 3, 725-728.
- SOUTHERN, P. J., and BERG, P. (1982). Transformation of mammalian cell to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341.
- TOOZE, J. (1980). "DNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses, Part 2." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- WEBER, J. M., SIRCAR, S., FLEURENT, J., and HAMEL, M. (1990). Drug-induced revertants of adenovirus-transformed cells: Retransformation by 5-azacytidine without reactivation of E1a. *J. Gen. Virol.* 71, 585-591.
- WEBER, J. M., SIRCAR, S., RODRIGUES, M., CAI, F., and HORVATH, J. (1991). Dominant suppression of adenovirus mediated transformation and insufficiency of p105Rb binding as a condition for oncogenic transformation. *Oncogene* 6, 989-993.
- WEINBERG, R. A. (1989). Positive and negative controls on cell growth. *Biochemistry* 28, 8263-8269.
- WHYTE, P., BUCHKOVICH, K. J., HOROWITZ, J. M., FRIEND, S. H., RAYBUCK, M., WEINBERG, R. A., and HARLOW, Ed (1988). Association between an oncogene and an antioncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124-129.
- WIGLER, M., PELLICER, A., SILVERSTEIN, S., AXEL, R., URLAUB, G., and CHASIN, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1373-1376.

VIRUS 00841

Reduction of *c-myc* expression correlated with E1a expression but not with the transformed phenotype

Patrick A. Dion, Johanne Fleurent, Dominique Roberge
and Joseph M. Weber

Département de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qué., Canada

(Received 11 February 1992; revision received 27 August 1992; accepted 1 September 1992)

Summary

The adenovirus E1a oncogene has both positive and negative regulatory effects on the expression of a variety of host genes. Both type of effects have been reported for certain cell cycle genes such as *c-myc*. To study the potential role of *c-myc* in adenovirus transformation, we have assessed the steady-state levels of *c-myc* mRNA after serum stimulation in genetically related transformed or non-transformed cell lines in the presence or absence of E1a. Serum stimulated the accumulation of stable *c-myc* mRNA only in cell lines which did not express E1a. Therefore under the present assay conditions, E1a had a negative effect on the steady-state level of *c-myc* mRNA. Surprisingly, this effect was independent of the transformed phenotype.

Oncogene; Transcription; *c-myc*; E1a; Adenovirus; Transformation

Introduction

Adenoviruses have been shown to have powerful effects on viral and host transcription. This transcriptional regulatory effect appears to be restricted to a single gene product, namely a 289 residue protein encoded by the region E1a 13s transcript. 289R is responsible for the transcriptional activation of all the early viral promoters as well as a growing list of cellular genes which includes Hsp70,

Correspondence to: J. Weber, Département de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Qué., Canada J1H 5N4. Fax (819) 564-5392.

DHFR, N-myc and others (reviewed by Berk, 1986; Shenk and Flint, 1991; Boulanger and Blair, 1991). Surprisingly 289R represses transcription from certain enhancer driven promoters such as the polyoma and SV40 early promoters, that of the immunoglobulin heavy-chain, as well as the insulin and cytochrome P450c control regions. None of the transcriptional activation functions are associated with the 243R protein encoded by a 12-s message from the same E1a promoter. Because the 243R protein is identical in sequence with the 289R protein, aside from a stretch of 46 amino acids present in the longer of the two proteins, these transcriptional effects have been attributed to this 46R domain. Surprisingly, the 243R product appears to be sufficient for cellular transformation (Shenk and Flint, 1991). This suggests that the transcriptional activation function resident in the 46R domain of the 289R protein may be dispensable for transformation. This notion is supported by the finding that both E1a proteins bind to the retinoblastoma gene product, Rb105 (Weinberg and Harlow, 1988), a tumor suppressor. It now appears that SV40, polyoma and human papovavirus 16 oncoproteins also bind the Rb105 protein (DeCaprio et al., 1988; Dyson et al., 1990; Munger et al., 1989), thus giving rise to a unified hypothesis of transformation by these DNA tumor viruses via the binding/inactivation of the Rb105 tumor suppressor. How does binding of viral oncoproteins to Rb105 lead to transformation? Recent reports appear to have answered this question. It appears that Rb105 inactivates the transcription factor E2F by binding to it (Chellappan et al., 1991). The binding of E1a to Rb frees E2F, which in turn activates the transcription of several cell cycle genes: N-myc and DHFR have been confirmed as targets of E2F, and c-myc, c-myb, c-fos and the EGF-receptor have been identified as likely targets (Hiebert et al., 1991). Therefore transcriptional regulation of cellular protooncogenes appears to be the most likely hypothesis to explain the mechanism by which DNA tumor viruses transform mammalian cells.

Using genetically related cell lines, we report results which, albeit consistent with this hypothesis, also show that the downstream phenotype, namely transformation, can be abrogated by an unidentified putative tumor suppressor gene.

Materials and Methods

Cells

All the cells used except G4F have been described before (Weber et al., 1990, 1991). They were grown in air-CO₂ incubators at 37°C in Petri dishes in Dulbecco's MEM with 5% fetal calf serum. Growth in soft agar (0.33% Noble agar, Difco) and in nude mice was performed as described previously (Sircar et al., 1987).

DNA, RNA and protein analysis

Total cellular DNA was extracted from 0.65% NP40-isolated nuclei by the SDS-proteinase K-phenol method and Southern blot analysis performed according

to standard procedures (Maniatis et al., 1982). RNA was purified from the cytoplasmic fraction in the presence of 1 mM vanadyl ribonucleoside complex (BRL), 3.5 M urea, 1% SDS (in 0.24 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.01 M

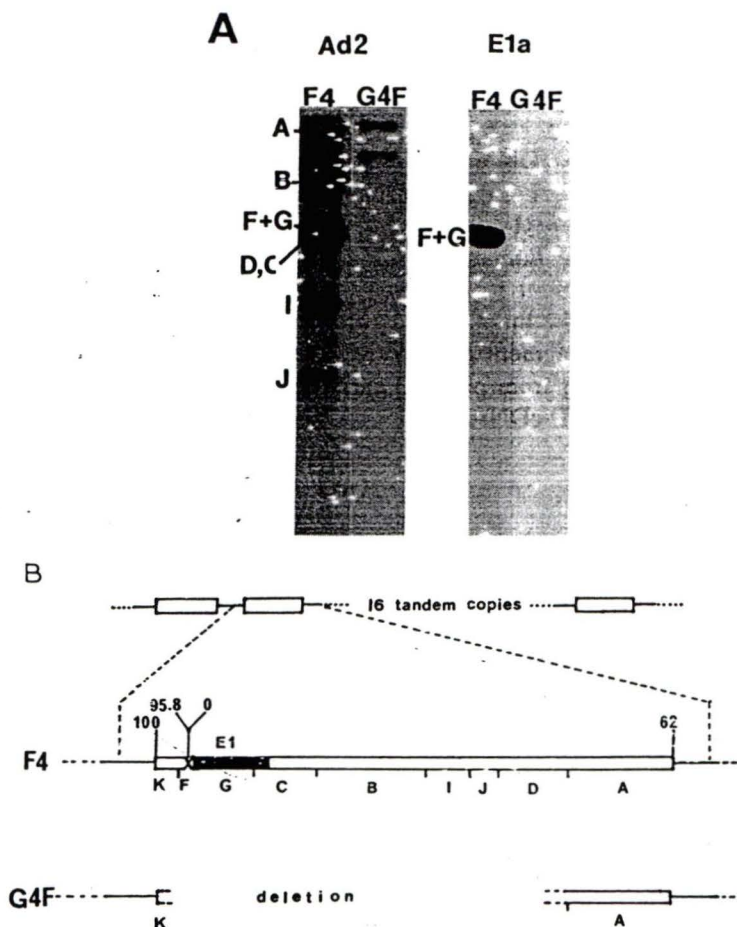


Fig. 1. Southern analysis of adenovirus sequences integrated in F4 and G4F cellular DNA. A. Cellular DNA was digested with *Hind*III, a Southern blot prepared and hybridized with an Ad2 genomic probe or an E1a probe. The autoradiogram shows the restriction fragments identified by letters: the G fragment, which contains the E1 region, is fused to the F fragment as shown in panel B. Note that G4F contains no hybridization signal corresponding to the E1 region. A comparison of the hybridization signal at band A between F4 (16 copies) and G4F suggests the equivalent of a single copy remaining in G4F. B. Interpretation of the hybridization results. The deletion suffered by the G4F cell line appears to have removed the 16 copies of tandemly amplified viral sequences with the exception of the right junction fragment represented by A. The figure only shows a single copy of the viral sequence as an open box, with the E1 region filled in and the flanking cellular sequences as a line. The broken lines indicate the approximate location of *Hind*III digestion sites.

EDTA) followed by phenol-chloroform extraction. Precipitated cytoplasmic RNA was resuspended in 50% formamide–5% formaldehyde–MOPS (Sigma Chem. Co.). Dilutions were made in $20 \times$ SSC and RNA was deposited on nitrocellulose filters presoaked in $20 \times$ SSC and fixed at 80°C for 2 h. Prehybridization was for 24 h at 42°C in 50% formamide– $5 \times$ Denhardt– $5 \times$ SSC– $100 \mu\text{g/ml}$ calf thymus DNA and $100 \mu\text{g/ml}$ yeast RNA, followed by hybridization at the same conditions with probe. The presence of E1a and E1b proteins were verified by immunoprecipitation using monoclonal antisera purchased from Oncogene Science, Inc.

Probes

E1a: either the 13-s cDNA released from plasmid 13SE1SVX by *Bam*HI digestion or the *Acc*I–*Ava*I fragment from pBE5 (nt 192 to nt 757; Stow, 1982). *c-myc*: the 1.8 Kb *Eco*RI–*Hind*III fragment from pSP64/myc (Amersham, RPN1314X) carrying the human exon 2 and part of its 3' sequence. *c-fos*: the *Xba*I–*Sma*I 2.9 Kb fragment from pSP64/*fos* (Amersham, RPN1315X), carrying the first three exons of the human *c-fos* and the 5' part of the fourth exon. *c-myb*: the *Kpn*I–*Xba*I *v-myb* fragment from pVM2 (Klempnauer et al., 1987). GAPDH; the 1.4 kb *Pst*I fragment from pGEM3 carrying a rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA.

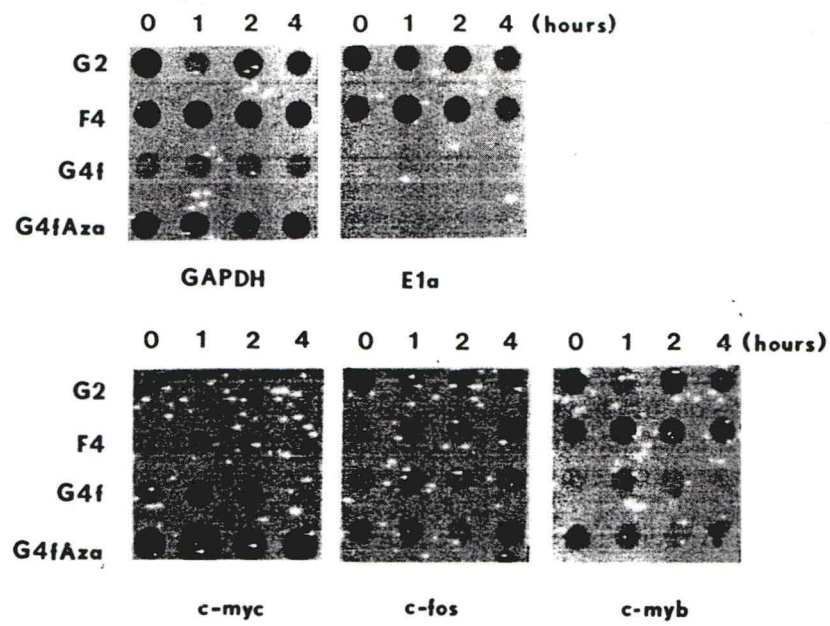
PCR primers

Nucleotide numbers are based on the Ad2 sequence. E1a enhancer/packaging region primers to amplify the segment from nt 186 to nt 380: 5'-CCGGTGTA-TACGGGAAGTGA-3' and 5'-TCCAGGTAAACGGTCAAAGT-3'. Right virus-cell boundary primers to amplify segment from nt 21774 to nt 22390: 5'-GCCATGGGCTCCAGTGAGC-3' and 5'-TTACATGTTTTTCAAGT-3'.

Results

Isolation of genetically related cell lines

To minimize differences in control mechanisms due to genetic variations, we developed a panel of related cell lines derived from a freshly recloned adenovirus type 2 transformed cell line. Three subclones of the parental F4 line, named G2, G4F and G4Faza expressed the desired properties for the objective of this study (Weber et al., 1990, 1991). The parental F4 line is fully transformed by the viral E1 genes, it grows in the absence of anchorage, and forms rapidly growing tumors in nude mice. G2 is a revertant of F4 which expresses functional E1 proteins but is not transformed and moreover is resistant to re-transformation by E1 bearing plasmids (Sircar et al., 1988). The G4F cell line has suffered a major deletion in the adenovirus insert relative to F4 as documented in Fig. 1. F4 contains an estimated 16 copies of the Ad2 left terminal 62% fragment joined to a right



(B)

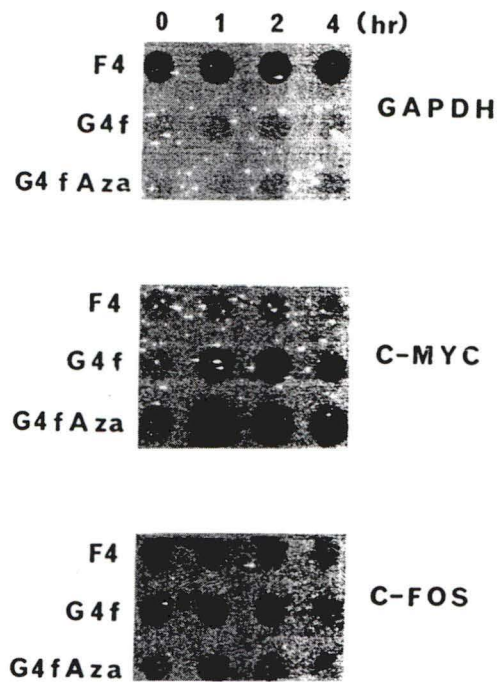


Fig. 2. Analysis of the expression of protooncogenes *c-myc*, *c-fos* and *c-myb* in transformed and revertant cells which express or do not express the adenoviral E1 genes. Monolayer cultures of cells were incubated for 24 h in low serum (0.5%) then stimulated by the addition of 10% FCS. Cytoplasmic RNA was extracted at 0, 1, 2 and 4 h after stimulation from single subconfluent petri dishes, dot-blotted and hybridized with radioactive probes. The two panels show the results of independent experiments. Autoradiograms were exposed for 48 h.

TABLE 1

Summary of the properties of cell lines

Cell line	E1a, E1b		Growth in soft agar	Tumors in nude mice
	Genes	Proteins		
F4	+	+	+	+
G2	+	+	-	-
G4F	-	-	-	-
G4Faza	-	-	+	+

genomic terminus fragment of 4% (Flint, 1981). Hybridization of *Hind*III restricted cellular DNA with an Ad2 genomic probe shows the right (A) and left (K) virus-cell fusion fragments remaining in G4F (Fig. 1A, lane 2). The relative hybridization signal intensity in G4F showed a reduction consistent with there remaining a single copy of vestigial adenovirus sequences. No hybridization signal corresponding to the E1 region (fragments G, C) was apparent. The absence of any trace of the E1 region in G4F cells was confirmed by hybridization of a similar blot with an E1a probe (Fig. 1, top right panel). This conclusion was independently confirmed by PCR analysis using primers from upstream of the E1a gene designed to amplify the region encompassed by nucleotides 186-380 (results not shown). PCR analysis was also used to confirm the right boundary (i.e. 62%) of the virus-cell junction (nt 21774-22390). Consistent with the absence of the viral transforming genes, the G4F cells do not contain E1 proteins and are non-tumorigenic (Weber et al., 1991). Treatment of these cells with 5-azacytidine gave rise to a transformed cell line referred to as G4Faza (Weber et al., 1990). For convenience, the properties of these cell lines are summarized in Table 1.

Expression of c-myc, c-fos and c-myb RNA in adenovirus transformed and revertant cells

We have analysed the expression of three protooncogenes in subconfluent monolayer cultures in response to serum stimulation. The cell cultures were maintained in 0.5% serum for 24 h prior to addition of 10% FCS. Cytoplasmic RNA was extracted at various time intervals after stimulation and hybridized with probes corresponding to the protooncogenes. Preliminary experiments showed that under these conditions the best results were obtained one to two hours after serum stimulation. Fig. 2 shows the results of a typical experiment. In order to minimize quantitative variations in RNA levels two precautions were taken: (1) RNA from a single petri dish was deposited in quintuplicate and, (2) one of these filters was also hybridized with a probe for the rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, whose expression is not influenced by adenovirus transformation (Ed Ziff, personal communication). The four remaining filters were hybridized with the indicated probes. Fig. 2 shows the results of two independent experiments although similar results were reproducibly obtained with this experi-

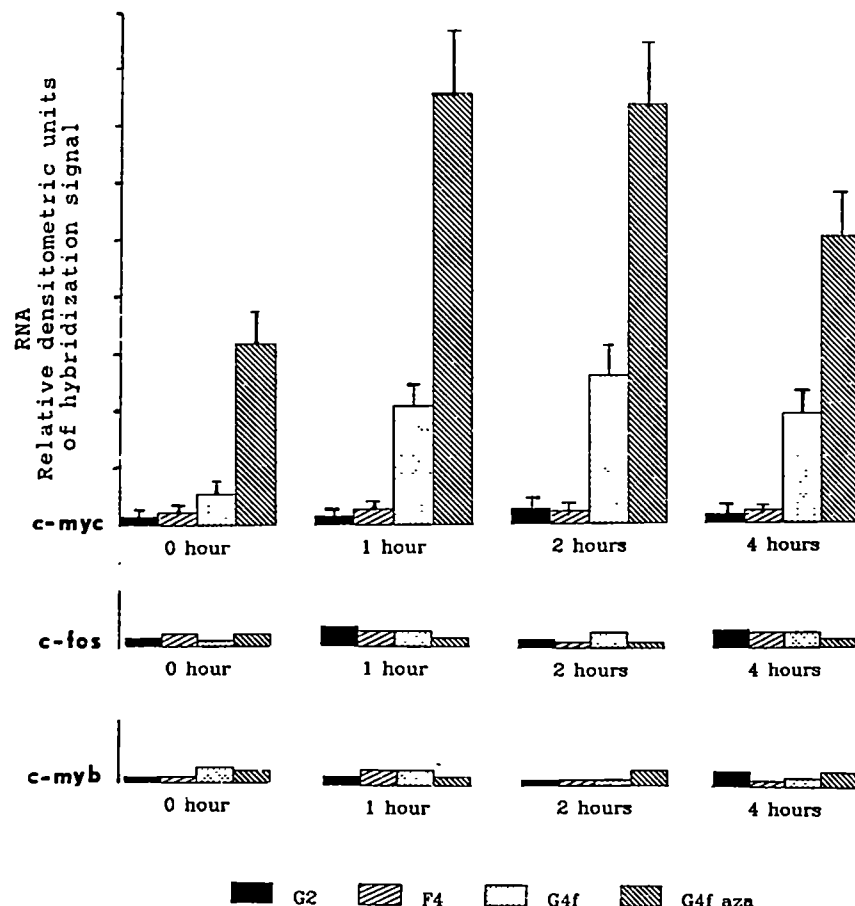


Fig. 3. Graphic representation of the mean results of several experiments. Appropriately exposed autoradiograms (such as those shown in Fig. 2) were scanned by a densitometer and the areas under the curves were expressed as relative densitometric units of hybridization signal. The results were normalized on the basis of the GAPDH signal, assuming that it represents the amount of RNA deposited on the filter. The vertical bars indicate the standard error. Note that stimulation was only observed in the case of *c-myc* in cells which don't express E1 gene products.

mental protocol. To facilitate interpretation the autoradiograms were scanned by a densitometer and histograms were constructed after normalization with respect to the GAPDH signal (Fig. 3). These results showed that the steady-state level of mRNA was increased only in the case of *c-myc* in cell lines devoid of E1a. The magnitude of stimulation of *c-myc* was proportional in G4F and G4Faza and was apparently independent of the transformed phenotype. Because neither the transformed F4 line nor the revertant G2 line responded to serum stimulation, we may conclude that the presence of E1a gene products abrogated the stimulation of *c-myc* expression. Again, this abrogation was independent of the transformed phenotype.

Discussion

Transcriptional stimulation of protooncogenes such as *c-myc*, *c-fos* and *c-myb* by the addition of mitogens to growth-factor starved mammalian cells in culture has been well established (Liu et al., 1985; Greenberg and Ziff, 1984; Reed et al., 1986; Denhardt et al., 1986). Because such genes tend to be targets of the transcriptional regulatory effects of DNA tumor virus oncogenes such as adenovirus E1a, we examined the importance of this effect for transformation in genetically related cell lines of both tumorigenic and non-tumorigenic phenotype.

Reproducible transcriptional stimulation, as measured by the steady-state level of RNA in this system was only obtained for *c-myc*. The failure to see a stimulation in the case of *c-fos* and *c-myb* can be accounted for by the time-frame used: (1) *c-fos* is normally stimulated very rapidly by serum but this stimulation is transient and gene expression returns to a basal level within an hour, (2) *c-myb* RNA levels increase very slowly, and would be observable only beyond the 4-h time point used here. Therefore, the *c-fos* and *c-myb* experiments may be regarded as negative controls which further validate the results obtained with *c-myc*. In the case of *c-myc* the two E1a negative cell lines were responsive to serum stimulation, the tumorigenic G4Faza line producing two to three times more RNA than the non-tumorigenic G4F line. Therefore the presence of the E1a gene products in the F4 and the G2 cell lines abrogated the transcriptional induction of *c-myc*. Because these cell lines were all derived from F4, the genetic relatedness argues against a simple cell-type specific effect.

An E1a mediated reduction of *c-myc* transcription has previously been shown to be a specific characteristic of adenoviruses (Timmers et al., 1988, 1989). The novel finding here is the dissociation of an obligatory link between E1a mediated *c-myc* suppression and a tumorigenic phenotype, as evidence by the G2 cell line. We have recently shown that the G2 cells resemble the parental transformed cells in their ability to form complexes between E1a and Rb105 or the 300 K cellular proteins but that the expression of a tumorigenic phenotype is prevented by a dominant tumor suppressor gene (Weber et al., 1991). It is conceivable that the tumorigenic effects of E1a are blocked at some point further downstream from the *c-myc* transcription suppression step by this putative tumor suppressor gene. In spite of great strides taken recently on the role of E1a in freeing the E2F transcription factor via the sequestration of its inhibitor (i.e. Rb105; Chellappan et al., 1991), the relative contribution of the transcription suppression versus the transcription activation functions of the E1a proteins towards the tumorigenic phenotype continues to remain elusive. Such opposing actions of E1a, and indeed of other proteins involved in transcriptional regulation, may find their explanations in the cellular-molecular context these effectors operate. Two recent reports are of particular interest in this regard. In both reports the introduction of the E1a gene resulted in the suppression of the tumorigenic phenotype: in one case via the transcriptional suppression of the neu oncogene (Yu et al., 1991) and in the other via a general restoration of a growth-inhibited phenotype of three human tumor cell lines (Frisch, 1991). Our results, combined with those of Timmers et al. (1988,

1989) and the above cited reports suggest that E1a may be considered as a prototype growth regulatory protein having context-specific transforming and tumor suppressor activities.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada. D.R. and P.A.D. were the recipients of studentships from the Cancer Research Society, Inc. and the Medical Research Council of Canada. We thank Edward Ziff for the GAPDH probe.

References

- Berk, A.J. (1986) Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Annu. Rev. Genet.* 20, 45-79.
- Boulanger, P.A. and Blair, G.E. (1991) Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem. J.* 275, 281-299.
- Chellappan, P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053-1061.
- Decaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.-Y., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988) SV40 Large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.
- Denhardt, D.T., Dylan, R.E. and Parfett, C.L.J. (1986) Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta* 865, 83-125.
- Dyson, N., Bernards, R., Friend, S.H., Gooding, L.R., Hassell, J.A., Major, E.O., Pipas, J.M., Vandyke, T. and Harlow, E. (1990) Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64, 1353-1356.
- Flint, S.J. (1981) Transformation by Adenoviruses. In: J. Tooze (Ed.), *DNA Tumor Viruses*, pp. 383-442. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Frisch, S.M. (1991) Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9077-9081.
- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438.
- Hiebert, S.W., Blake, M., Azizkhan, J. and Nevins, J.R. (1991) Role of E2F transcription factor in E1A-mediated trans activation of cellular genes. *J. Virol.* 65, 3547-3552.
- Klemmner, K.H., Gonda, T.J. and Bishop, J.M. (1982) Nucleotide sequences of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* 31, 453.
- Liu, H.T., Baserga, R. and Mercer, W.E. (1985) Adenovirus type 2 activates cell cycle-dependent genes that are a subset of those activated by serum. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2936-2942.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Münger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E. and Howley, P.M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J.* 8, 4099-4105.
- Reed, J.C., Alpers, J.D., Nowell, P.C. and Hoover, R.G. (1986) Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3982-3986.
- Shenk, T. and Flint, J. (1991) Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv. Cancer Res.* 57, 47-85.

- Sircar, S., Palkonyay, L., Rodrigues, M., Allaire, S., Horvath, J., Thirion, J.-P. and Weber, J. (1987) Isolation of variants resistant to methylglyoxal bis(guanyldrazone) from adenovirus-transformed rat cells. *Cancer Res.* 47, 1339-1343.
- Sircar, S., Rodrigues, M. and Weber, J.M. (1988) Resistance to retransformation by adenovirus but not by heterologous oncogenes in an E1-positive transformation revertant cell line may be mediated by a cellular function. *Oncogene* 3, 725-728.
- Stein, E. and Ziff, E.B. (1984) HeLa cell B-tubuline gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1a dependant mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2792-2795.
- Stow, N.D. (1982) The infectivity of adenovirus genomes lacking DNA sequences from their left-hand termini. *Nucl. Acids Res.* 10, 5105-5119.
- Timmers, H.T.M., De Wit, D., Bos, J.L. and Van Der Eb, A.J. (1988) E1A products of adenoviruses reduce the expression of cellular proliferation-associated genes. *Oncogene Res.* 3, 67-76.
- Timmers, H.T.M., Van Dam, H., Pronk, G.J., Bos, J.L. and Van der Eb, A.J. (1989) Adenovirus E1A represses transcription of the cellular JE gene. *J. Virol.* 63, 1470-1473.
- Weber, J.M., Sircar, S., Fleurent, J. and Hamel, M. (1990) Drug-induced revertants of adenovirus-transformed cells: retransformation by 5-azacytidine without reactivation of E1a. *J. Gen. Virol.* 71, 585-591.
- Weber, J.M., Sircar, S., Rodrigues, M., Cai, F. and Horvath, J. (1991) Dominant suppression of adenovirus mediated transformation and insufficiency of p105Rb binding as a condition for oncogenic transformation. *Oncogene* 6, 989-993.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.M. and Harlow, E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1a proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124-129.
- Yu, D., Scorsone, K. and Hung, M.-C. (1991) Adenovirus type 5 E1a gene products act as transformation suppressors of the neu oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1745-1750.

OK